

KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉS

GLÜKOKORTIKOID HORMONOK ÁLTAL MEDIÁLT
MECHANIZMUSOK ÉS A MACROPHAGOK SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA KÍSÉRLETES ENDOTOXIN ÉS SZEPTIKUS SOKKBAN

Írta:

ifj. Dr. Lázár György

Szeged

1993

TARTALOM JEGYZÉK

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK	1. oldal
TÉMA FELVETÉS	13. oldal
CÉLKITŰZÉSEK, A KUTATÁSOK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE	17. oldal
KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19. oldal
1. Kísérleti állatok	19. oldal
2. Kísérleti anyagok	19. oldal
3. Kísérleti módszerek	20. oldal
Endotoxin tolerancia előidézése	20. oldal
Szeptikus sokk előidézése	20. oldal
Reticuloendothelialis blokádd előidézése	22. oldal
RES aktivitás meghatározása	23. oldal
Multilamelláris liposoma készítése	24. oldal
Az újszülöttkori wasting szindróma előidézése	25. oldal
Tumor nekrosis faktor klónozása és termelése	25. oldal
Tumor nekrosis faktor tisztítása és meghatározása	26. oldal
Sejttenyésztés	27. oldal
Statisztikai analízis	27. oldal
KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	28. oldal
1. Az RU 38486 hatása a kísérletes szeptikus és endotoxin sokk lefolyására	28. oldal
2. Az RU 38486 hatása a TNF termelésére	35. oldal
3. Az RU 38486 hatása a hTNF toxicitására	40. oldal

4. Az RU 38486 hatása a kísérletes újszülöttkori wasting szindrómára	43. oldal
5. GdCl ₃ hatása a kísérletes szeptikus sokk lefolyására	48. oldal.
6. A GdCl ₃ és a karragenin hatása az endotoxin eloszlására, az endotoxin érzékenységre és a TNF termelésre	54. oldal
MEGBESZÉLÉS	62. oldal
ÖSSZEFOGLALÁS, FŐ KÖVETKEZTETÉSEK	76. oldal
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79. oldal
IRODALOM	80. oldal

Az értekezésben előforduló orvosi szakkifejezések, idegen eredetű szavak írásmódjánál az MTA Orvosi Tudományok Osztálya 1987 június 16-i ülésén és az MTA Helyesírási Bizottsága és Anyanyelvi Bizottsága 1987 november 9-i együttes ülésén elfogadott irányelveket alkalmaztam. (irodalom: Orvosi Helyesírási Szótár, főszerkesztők: Dr. Fábián Pál és Magasi Péter, Akadémiai Kiadó, 1992)

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTH - adrenokortikotrop hormon

ARDS - Adult **R**espiratory **D**istress **S**yndrome

GdCl₃- gadolinium klorid

IL-1 - interleukin-1

IL-1Ra - interleukin-1 receptor antagonista

IL-6 - interleukin-6

IL-8 - interleukin-8

LPS - lipopolisacharid

NK - Natural **K**iller (sejt)

NO - nitrogén-oxid

PAF - **P**latlet **A**ctivating **F**actor

RES - **R**eticuloendothelialis **S**ystem

TNF - tumor **n**ekrózis **f**aktor

hTNF - **h**umán tumor **n**ekrózis **f**aktor

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

A szeptikus sokk a mai modern sebészetben is igen gyakori, súlyos komplikáció. A számos új terápiás módszer ellenére a kórkép halálozása az utóbbi években is eléri az 50%-ot (Cohen és Glauser, 1991). Az Egyesült Államokban jelenleg a 13. vezető halálok, évente közel 300 ezer a regisztrált betegek száma (Centers for Disease Control, 1987; National Center for Health Statistics, 1989).

Az elmúlt évtizedekben számos fogalmat, mint szepszis, súlyos szepszis, szeptikémia, szeptikus sokk, egymás szinonímájaként használtak az irodalomban. Ez sokszor számos félreértést, helytelen következtetést vont maga után. Az American College of Chest Physicians/Society of Critical Medicine Consensus Conference 1991-ben került megrendezésre, melynek résztvevői megegyezésre jutottak a különböző definíciókat illetően:

Generalizált/Szisztémás gyulladásos válasz szindróma (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) - Szisztémás/generalizált gyulladásos válaszareakció a szervezetet ért különböző behatásokra (trauma, égés, pancreatitis, infekció, egyéb okok). A válaszareakció az alábbi tünetekből kettő vagy több együttes fennállása esetén definiálható:

Testhőmérséklet $> 38^{\circ}\text{C}$ vagy $< 36^{\circ}\text{C}$

Szívfrekvencia $> 90/\text{perc}$

Légzésszám $> 20/\text{perc}$ vagy $\text{PaCO}_2 > 32 \text{ torr} (> 4,3\text{kPa})$

Fehérvérsejtszám $> 12.000 \text{ G/l}$, vagy $< 4.000\text{G/L}$,

vagy 10%-nál több az éretlen (pálca) alak

Szepszis - Infekcióra létrejövő szisztémás/generalizált válaszreakció.

Súlyos szepszis - Szervi diszfunkcióval, hypoperfusioval vagy hypotensioval járó szepszis. A hypoperfusio következményei magába foglalhatják, de nem kizárólagosan a tejsav acidosist, oliguriát, vagy a mentális status akut megváltozását.

Szeptikus sokk - Hypotensioval járó súlyos szepszis, mely a megfelelő folyadék terápia ellenére is fennáll.

Hypotensio - A szisztolés artériás nyomás < 90 Hgmm, vagy annak csökkenése > 40 Hgmm, és egyéb hypotensiot okozó körülmény egyidejűleg nem áll fenn.

A szeptikus sokkot általában Gram-negatív bacteriaemia következményeként szokták definiálni, de valójában Gram-pozitív baktériumok, gombák, vírusok, paraziták külön-külön, illetve együttesen is okozhatják (Glauser és mtsai, 1991). Gram-negatív baktériumok 30%-80%-ban, míg a Gram-pozitív baktériumok 6%-24%-ban vesznek részt a fertőzés, illetve a szeptikus sokk létrehozásában. Az esetek többségében azonban a kórokozókat nem lehet pontosan identifikálni (Bone és mtsai, 1987; Isphani és mtsai, 1987; Calandra és mtsai, 1988).

Több klinikai és kísérletes megfigyelés szerint a sokk állapotok patomechanizmusában, függetlenül a sokkot kiváltó etiológiai tényezőtől, számos hasonlóság áll fenn. Ezek alapján a kutatók már igen korán

feltételezték, hogy sokk állapotokban közelebbről meg nem határozott, közös bakteriális vagy metabolikus-toxikus faktor, vagy faktorok szerepelnek, melyek a kapilláris fal károsodásához, a vér stagnálásához, a szöveti perfúzió csökkenéséhez vezetnek. Az egyik legismertebb felfogás szerint (Fine, 1954; Fine és mtsai, 1959) ez a közös toxikus anyag, a bélből felszívódó - a Gram-negatív baktériumok sejtfalának külső membrán alkotója - a bakteriális endotoxin vagy más néven bakteriális lipopoliszacharid (LPS). Sokk állapotokban, az ischaemia miatt csökken a bél barrier funkciója, így az endotoxin - melyet a máj hipoxiás károsodása folytán, a Kupffer sejtjei nem tudnak közömbösíteni - bejut a szisztémás keringésbe. A bakteriális endotoxinnak, mint a sokk állapotok közös etiológiai faktor szerepét játszó toxikus anyagnak a fontosságát későbbi kutatások is megerősítették. Selye és mtsai (1966) kimutatták, hogy az ólom acetát a patkányok endotoxin érzékenységét a különböző Gram-negatív baktériumok endotoxinja iránt jelentősen növeli. Az ólomacetátnak ezen tulajdonságát felhasználva, több szerző is kimutatta a bélből felszívódó bakteriális endotoxin szerepét különböző etiológiájú sokk állapotokban (Filkins és Buchanan, 1973, Kisida és mtsai, 1974; Csordás és Bertók, 1983; Orbán és mtsai; Bertók, 1985)

Az endotoxin szerepe kulcsfontosságú a szeptikus sokk kialakulásában (Suffredini, 1992). Közel száz éve, Richard Pfeiffer megfigyelése óta ismerjük a bakteriális endotoxin sokk indukáló hatását (Brade és mtsai, 1977). Pfeiffer vizsgálataiban hővel elölt *Vibrio cholerae* lysátumával, kísérleti állatokban súlyos sokk állapotot és letális hatást tudott előidézni. Pfeiffer nevezte el a baktériumok hőstabil komponensét endotoxinoknak, megkülönböztetve a bakteriális exotoxinoktól. Elsőként Boivin és Mesrobianu dolgoztak ki egy endotoxin tisztítási eljárást, és ők írták le az endotoxin fő strukturális jellemzőjét, a lipopolisaccharid-fehérje-phospholipid szerkezetet (Wethphal és mtsai, 1977).

Később, Westhpal és más kutatóknak is sikerült izolálniuk az endotoxin aktív fehérjementes részét (Luderitz és mtsai, 1963; Westhpal és mtsai, 1978).

Az endotoxin kb 200.000 D molekulasúlyú makromolekulák heterogén csoportja. Szerkezetileg három fő alkotó eleme van: a külső poliszacharid lánc (O antigén, O-Ag), mely elsősorban az antigenitásért felelős, a belső poliszacharid lánc, mely a lipid és a külső poliszacharid lánc között helyezkedik el, és a lipid A-rész, mely telítetlen zsírsavak láncolata (Glauser és mtsai, 1991). Ezutóbbi felelős elsősorban az endotoxin toxikus hatásaiért (Galanos és mtsai, 1971). Az endotoxin emlős szervezetben jellegzetes biológiai reakciók sorozatát váltja ki (Nowotny, 1964; Agarwal és Lázár, 1977). A kezdeti kutatásokban a bakteriális endotoxinnak az érrendszerrel (Thomas, 1956), szimpatikus idegrendszerrel (Agarwal, 1974; Kertai és mtsai 1975), endocrin rendszerrel (Hall és mtsai, 1964; Filkins, 1976), anyagcserével (Jeffries, 1969; Kováts és mtsai, 1960; Lázár és mtsai, 1960), véralvadási rendszerrel (McKay és mtsai, 1969), reticuloendothelialis rendszerrel (Beeson, 1947; Chedid és mtsai, 1971), fehérvérsejtekkel (Becker, 1948; Filkins, 1976) való kölcsönhatását hangsúlyozták. Hasonlóképpen fontosnak ítélték az endotoxin hatására létrejövő hisztamin felszabadulást (Hinshaw és mtsai, 1961; Schayer, 1960), valamint az endotoxinnal szemben az emlős szervezetben kifejlődő endotoxin hypersensitivitást (Kováts, 1961; Kováts és mtsai, 1963).

Az utóbbi évek kutatásai feltárták, hogy a legtöbb endotoxin hatás a szervezet saját gyulladásos mediátor rendszerének aktivációjára vezethető vissza (Waage és mtsai, 1991; Parrillo, 1993). Az endotoxin a véráramba kerülését követően számos humorális és celluláris reakciót indít el, melyek egymással szoros kölcsönhatásban alakítják ki a szeptikus sokk tünetegyüttesét, a különböző szervi és szöveti károsodásokat, valamint a letális hatást. A

komplement rendszer aktivációja révén vasodilatatio, emelkedett vasculáris permeabilitás, továbbá thrombocyta és leukocyta aggregáció alakul ki, melyeknek fontos szerepük van a szeptikus sokk során létrejövő hypotensióban, valamint az ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome) patogenezisében (Jacobs, 1981; Hack és mtsai, 1989). Az aktivált leukocyták többek között szabadgyökök és különböző lizoszomális enzimek felszabadulását hozzák létre, valamint felelősek az adhéziós molekulák képződésében, az arachidonsav metabolizmus és a lipidperoxidáció elindításában (Reines és mtsai, 1982; Jacobs, 1981; Hack és mtsai, 1989). Az endotoxin súlyos véralvadási zavart és diffúz intravascularis coagulatiót is okoz (Spika és mtsai, 1982; Warr és mtsai, 1990). A szeptikus sokk alatt jelentkező súlyos hypotensio kialakulásában a kinin-kallikrein rendszer aktivációja során felszabaduló vasoactiv kininek, valamint a részben endothel sejtek által termelt nitrogén-oxid (NO) is fontos szerepet játszik (Colman, 1989; Palmer és mtsai, 1987).

Az utóbbi évek kutatásai irányították a figyelmet az endotoxin és a macrophag rendszer kapcsolatára. A macrophagok ugyan különböző szervezetekben helyezkednek el, de közös tulajdonságaik alapján funkcionális egységet képeznek. A sejrendszer jelölésére a [^]Reticuloendotheliális System[^] (RES) elnevezést használjuk általában (Aschoff, 1924), mely fogalom a közös funkcionális alapokon nyugszik. Kezdetben a macrophagokat elsősorban [^]utcaseprő[^], [^]scavanger[^] sejteknek tartották, melyek feladata a szervezetbe került idegen anyagok, fertőző mikroorganizmusok, valamint elpusztult sejtek, sejttörmelékek bekebelezése, elpusztítása. A macrophagokkal kapcsolatos újabb vizsgálatok feltárták, hogy a macrophagok számos aktív anyag, így enzimek (Söderling és Knuutila, 1980), komplement fehérjék (Brade és mtsai, 1977; Davies és mtsai, 1980), prostaglandinok (Humes és mtsai, 1977), lysozym

(Gordon és mtsai, 1974), interferon (Olstad és mtsai, 1981), tumor nekrosis faktor (Carswell és mtsai, 1975), különböző interleukinok (Dinarello, 1984; Decker, 1990) és egyéb, kevésbé jól jellemzett anyagok termelésére képesek, mely anyagok közvetítenek és módosítanak számos szöveti reakciót és szabályozzák a macrophagok más sejtekkel való kölcsönhatását. Mai ismereteink szerint a macrophagok nemcsak számos fiziológiai folyamatban, így a celluláris és humorális immunválasz kialakulásában (Nelson, 1981), a vérképzésben (Bennet és Kay, 1981), anyagcsere- és gyógyszermetabolizmusban (Govier, 1965; Cantrell és Bresnick, 1972), az intravasculáris véralvadásban (Lee, 1962) játszanak fontos szerepet, hanem olyan kórfolyamatokban képezik a szervezet védekező mechanizmusának fontos részét, mint a fertőzések (Murray és Cohn, 1980), a gyulladás (Davies és mtsai, 1980), a rosszindulatú daganatos megbetegedések (Murray és Cohn, 1980, Weinberg, 1981). Az elmúlt néhány év kutatásai igazolták, hogy a macrophagok szerepe meghatározó a szeptikus sokk patogenezisében is (Spooner és mtsai, 1992).

A szeptikus sokk során a véráramba kerülő endotoxin önállóan és szérum fehérjével (un. LBP, LPS binding protein) komplexet képezve is képes a macrophag rendszer aktiválására (Wright és mtsai, 1990; Schumann és mtsai, 1990). Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a macrophagok endotoxin hatására létrejövő mediátor túlprodukciója, elsősorban a TNF és bizonyos interleukinok, mint az interleukin 1, 6 és 8, felelős szeptikus sokkban a szervi károsodásokért és a letális hatásért is (Spooner és mtsai, 1992; Cerami, 1992; Beutler, 1992). Ezek között is kiemelkedő jelentősége van a tumor nekrosis faktornak (TNF), vagy más néven cachectinnek.

A TNF egy 157 aminosavból, 17 kD tömegű alegységekből álló fehérje (Beutler és mtsai, 1985a,c), melyet elsősorban macrophagok, emellett más sejtek, mint a T és B lymphocyták, Natural Killer (NK) sejtek, astrocyták stb. is

termelnek (Tracy és Cerami, 1992). A TNF felfedezésekor - egymástól függetlenül - két eltérő hatását írták le, mely magyarázza kettős elnevezését. Kísérleti állatban egyrészt súlyos cachexiát, trigliceridaemiát (Guy, 1975), másrészt transzplantálható tumorok nekrozisát képes előidézni (Carswell, 1975). A tumor nekrozis faktor elnevezés Carswell és munkatársaitól származik, mikor megfigyelték, hogy BCG (*Bacille Carnette-Guerin*)-vel kezelt kísérleti állatok szérumában egy új, eddig ismeretlen fehérje jelenik meg, mely feltehetően felelős az állatok daganatainak nekrozisáért. Magát a jelenséget már 1893-ban Williem Coley, később Hartwell (1943) és OMalley (1963) is leírták. Ha daganatos betegeket, illetve kísérleti állatokat baktériummal vagy endotoxinnal kezelnek, a daganat visszafejlődése észlehető. Ezen korábbi megfigyelések arra vezethetők vissza, hogy a TNF szintézisét legerősebben a bakteriális endotoxinok (Beutler és Cerami, 1987; Rock és Lowry, 1991) emellett vírusok, gombák, protozonok és a bakteriális exotoxinok fokozzák (Wong és Goeddal, 1986; Hotez és mtsai, 1984). A TNF igen sokrétű biológiai aktivitást képes kifejteni közvetlenül vagy áttételesen. Mint gyulladásos mediátornak, fontos szerepe van a fertőzések elleni védelemben. Lázkeltő hatása van, mely a hypothalamus prosztaglandin szintézisének fokozása révén jön létre (Dinorello és mtsai, 1986), továbbá fokozza a leukocyták aktivációját, marginációját és transzendotheliális migrációját (Gamble és mtsai, 1985; Shalabay és mtsai 1985; Moser és mtsai, 1989), valamint ismert vírus és gomba ellenes hatása is (Djeu és mtsai, 1986; Philip és Epstein, 1986). A TNF emellett jelentősen befolyásolja az anyagcsere folyamatokat is. Ezek a hatások a periféris szövetekben elsősorban katabolikus jellegűek, mivel hatására fokozódik a fehérjék, a zsírszövet lebomlása (Warren és mtsai, 1987; Zechner és mtsai 1988) és gátlódik a zsírsavak szintézise (Beutler és mtsai, 1985c). Ezen hatásokkal magyarázható a TNF krónikus adására a kísérleti állatokban

létrejövő wasting szindróma is (Fong és mtsai, 1989). A TNF, a perifériás szövetekkel ellentétben a májban az anabolikus folyamatokat erősíti: fokozza az aminosavak felvételét, a lipogenezist és az akut fehérjék szintézisét (Fong és mtsai, 1989; Warren és mtsai, 1987; Feingold és mtsai, 1987). Ezenkívül számos egyéb hatással is rendelkezik: mint pl. számos egészséges diploid sejtnak növekedési faktora, angiogenetikus hatású (Rock és Lowry, 1991; Tracey és Cerami, 1992).

A szeptikus sokk kialakulásáért is felelős TNF hatása nagyfokban hasonlít az endotoxinnak tulajdonított tünetekhez. A TNF mellett, hogy interleukin 1, 6, 8, thrombocyta aktiváló faktor (PAF, **platelet-activating factor**) termelődést vált ki (Nawroth és mtsai, 1986; Shalaby és mtsai, 1989; Bonavida és mtsai, 1989), az arachidonsav metabolizmus aktiválásán keresztül eicosanoid produkciót is indukál (Petrak és mtsai, 1989). Fokozza a leukocyták és az endothel sejtek adhézióját és a leukocyták phagocyta aktivitását (Gamble és mtsai, 1985; Shalaby és mtsai, 1985). A TNF képes aktiválni a véralvadási rendszert (Van der Poll és mtsai, 1990), valamint szabadgyök képződést indukál (Zimmerman, 1992), és direkt toxikus hatása van az endothelialis sejtekre (Sato és mtsai, 1986).

Számos adat gyűlt össze arra vonatkozóan, hogy a TNF-nek kulcsfontosságú szerepe van a szeptikus sokk patogenezisében (Tracey, 1991; Spooner és mtsai 1992). Klinikai vizsgálatok szerint a szérum szintje jól korrelál a szeptikus sokk súlyosságával, illetve végső kimenetelével (Girardin és mtsai, 1988; de Groote és mtsai, 1989). Kísérleti állatban rekombináns TNF beadását követően súlyos hypotensiot, metabolikus acidózist, hemokoncentrációt és letális hatást okoz (Tracey és mtsai, 1987; Natanson és mtsai, 1989). Továbbá

kimutatták, hogy monoklonális TNF ellenes ellanyagokkal jelentősen fokozható a kísérleti állatok rezisztenciája az endotoxin és a szeptikus sokk letális hatásával szemben (Beutler és mtsai, 1985b; Tracey és mtsai, 1986).

A szeptikus sokk másik kulcsfontosságú mediátorát, az interleukin 1 (IL1)-t is elsősorban macrophagok termelik (Dinorello, 1983). Szintézisét legerősebben a bakteriális endotoxin, de a TNF és maga az IL1 is fokozza (Gery és mtsai, 1981; Oppenheim és mtsai, 1982). Az IL1 a TNF-hez hasonlóan fokozza a leukocyták aktivitását, a leukocyta-endothel adhéziót (Bevilacqua és mtsai, 1985) az intravasculáris coagulatio kialakulását (Bevilacqua és mtsai, 1984), továbbá PAF (Dejana és mtsai, 1987; Mizoguchi és mtsai 1991) és eicosanid termelődést indukál (Raz és mtsai, 1988). Szérum szintje általában emelkedett szeptikus betegekben (Calandra és mtsai, 1990), önállóan is képes a szeptikus sokk számos klinikai tünetét előidézni (Smith és mtsai, 1992), valamint jelentősen fokozza a TNF sokk indukáló hatását (Okusawa és mtsai, 1988; Waage és Espvik, 1989). Az elmúlt években hívták fel a figyelmet, szintén elsősorban a macrophagok által termelt, interleukin 6 fontosságára a szeptikus sokk patogenezisében (Helfgott és mtsai, Molloy és mtsai, 1993). Szérum szintje, hasonlóan a TNF- és IL-1-hez, emelkedett és prognosztikai értékű szeptikus sokkban (Waage és mtsai, 1989).

A szeptikus sokkban kialakuló hypotensioért és a szervi károsodásokért elsősorban a vasculáris endothelen lezajló folyamatok felelősek (Dinorello és mtsai, 1993). A TNF és az IL1 az endothelsejtek aktiválásán keresztül PAF (Dejana és mtsai, 1987; Mizoguchi és mtsai, 1991), PGE (Raz és mtsai, 1988), NO (Kilbourn és mtsai, 1990, Beasley és mtsai, 1991) szintézist vált ki, melyek vasodilatatiót és hypotensiot okoznak. Ez vezet a továbbiakban a csökkent

szervi perfúzióhoz, acidózishoz és később szervi elégtelenségekhez. A TNF és az IL1 az adhézións molekulák képződését is kiváltják, melyek fokozzák a leukocyták és az endothel sejtek adhéziónját, valamint IL8 (Martich és mtsai, 1991; van Deventer és mtsai, 1993) felszabadulását is előidézik. Az IL8-nak fontos szerepe van a leukocyták extravascularis térbe való jutásában (Huber és mtsai, 1991), és a leukocytákból a különböző enzimek, oxigen szabadgyökök felszabadításában (Rampart és mtsai 1989; Willems és mtsai, 1991), melyek súlyos szöveti károsodásokat eredményeznek. A vascularis endothelen lezajló folyamatokat a bakteriális endotoxin, illetve egyéb bakteriális toxinok a komplement aktiválásán keresztül is létrehozhatják (Billiau és Vandekeckhove, 1991).

A szeptikus sokkal szembeni rezisztencia fenntartásában lényeges szerepet töltenek be a glükokortikoid hormonok. Pontos kórélettani szerepük tisztázása segítséget nyújthat a klinikum számára a szeptikus sokk máig megoldatlan terápiájához. Régóta ismert, hogy az endogén glükokortikoidoknak meghatározó szerepe van a szervezet védekező mechanizmusában különböző sokk és stressz állapotokban (Selye, 1941; Petri, 1965; Kendall 1971). A glükokortikoid hormonok nemcsak az anyagcsere folyamatokat, hanem a phagocytosisban, immunválaszban, gyulladásban résztvevő sejtek működését is befolyásolják és ezáltal jelentősen módosítják a szervezet reakciókészségét és védekező mechanizmusát. A szeptikus sokk patogenezisében lényeges szerepet játszik a Gram-negatív baktériumok sejtfal anyaga, a bakteriális endotoxin (Suffedrini, 1992). Az általa kiváltott biológiai reakciók jelentős része a glükokortikoid hormonok ellenőrzése alatt áll (Ismahan és Agarwal, 1979; Agarwal és Lázár, 1984). Kimutatták, hogy az endotoxin károsító hatásaival szemben, beleértve a letális hatást is, a kísérleti állat rezisztenciája jelentősen

növelhető glükokortikoid hormonok adásával (Agarwal és Lázár, 1977; Hinshaw, 1988), azonban mind a klinikai, mind a kísérletes szeptikus sokkban a glükokortikoid hormonok kedvező hatása a mai napig vita tárgyát képezi (Sjölin, 1991; Hinshaw, 1988). Igen sok munka foglalkozik a glükokortikoid hormonok kedvező hatásával nemcsak az endotoxin, hanem más etiológiájú sokk állapotokban is. Így kimutatták, hogy a glükokortikoidok a lisosomális membránstabilizáló és a sympathico-adrenális válaszreakciót módosító hatásuk révén kedvezően befolyásolják a haemorrhagias sokk lefolyását is (Nagy és mtsai, 1964, 1970)

A glükokortikoid hormonok lényeges szerepét az endotoxin és szeptikus sokkal szembeni rezisztencia fenntartásában több kísérletes és klinikai vizsgálat igazolta. Jótékony hatásukat számos ok magyarázhatja: stabilizálják többek között a sejt és lysosoma membránt (Weismann és Thomas, 1962; Mothsay és mtsai, 1970), gátolják a komplement aktivációt és a komplement indukálta leukocytá aggregációt (Hammerschmidt és mtsai, 1979; Skubitz és mtsai, 1981), javítják a myocardium teljesítményét (Lozman és mtsai, 1975), és antagonizálják a kóros metabolikus hatásokat (Schumer W, 1975) szeptikus sokkban. Fontos szerepet játszhat ezenfelül az általános gyulladáscsökkentő hatásuk is, mely elsősorban a phospholipase A_2 gátló, lipocortin szintézis fokozása révén jön létre (Hirata és mtsai, 1980; Vadas és mtsai, 1988). Az elmúlt évek kutatásai ismerték fel a glükokortikoidok és a szeptikus sokk macrophag mediátorainak szoros kapcsolatát. A glükokortikoidok többek között gátolják a TNF és az Interleukin 1 szintézisét (Beutler és mtsai, 1986; Knudsen és mtsai, 1987; Waage, 1987), valamint csökkentik cytotoxikus (Tsiyimoto és mtsai, 1988; Kull, 1988), sokk indukáló és letális hatásukat is (Libert és mtsai, 1991). Ismertes továbbá, hogy a glükokortikoidok jelentősen csökkentik az endotoxin, TNF és

IL-1 hatására felszabaduló NO szintézisét, melynek szerepe meghatározó a szeptikus sokk során jelentkező vasodilatatio és a következményes hypotonia kialakulásában. (Rees és mtsai, 1990; Radomski és mtsai, 1990). A steroid hormonok fontosságát igazolják a szeptikus sokkal szembeni rezisztencia fenntartásában azok a megfigyelések is, hogy a mellékvese kiirtás jelentősen fokozza a kísérleti állatok érzékenységet bakteriális endotoxinnal, TNF és IL-1-el szemben, és ez a fokozott érzékenység felfüggeszthető szteroid hormonok adásával (Hinshaw és mtsai, 1985; Bertini és mtsai, 1988). Hasonlóképpen egy közelmúltban megjelent klinikai tanulmány is, melyben egészséges önkénteseken kimutatták, hogy közvetlenül az endotoxin bevitele előtt adott intravénás hydrocortison, szignifikánsan csökkentette az endotoxinok hatására felszabaduló cytokinek, a TNF, az interleukin 1, 6, 8 szérumszintjét, valamint felfüggesztette az endotoxin egyéb metabolikus és klinikai hatásait (Santos és mtsai, 1993).

TÉMA FELVETÉS

A glükokortikoidok szerepének jobb megismeréséhez járulhatnak hozzá, a klinikum számára is nagy jelentőséggel bíró, a specifikus glükokortikoid, progeszteron antagonistá RU 38486 (Mifepristone)-al [Roussel Uclaf, Franciaország] végzett kutatások (Philibert, 1984). Jelenleg a klinikai gyakorlatban főleg antiprogeszteronként, a korai terhesség megszakításban használják (Rodger és Baird, 1987; Silvestre és mtsai, 1990). Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai szerint az RU 38486 specifikusan a cytosol agonista kötőhelyén hatva, felfüggeszti a glükokortikoid hormonok katabolikus [thymusban] és anabolikus [májban] hatását (Lázár és Agarwal, 1986a; Agarwal és mtsai, 1987). Ezen kísérletek az első bizonyítékát adták annak, hogy egy, a glükokortikoid receptor szintjén ható anyag, szenzibilizál az endotoxin hatásával szemben és képes felfüggeszteni a genetikusan endotoxin rezisztens C3H/HeJ egértörzs endotoxin rezisztenciáját (Lázár és Agarwal, 1986b).

Ismeretes, hogy endotoxin előkezeléssel is jelentősen fokozható a kísérleti állatok rezisztenciája az endotoxin letális hatásával szemben (Balogh és mtsai, 1973; Agarwal és Lázár, 1977). Mindezek alapján érdemesnek látszott megvizsgálni az RU 38486 hatását endotoxin és szeptikus sokk körülményei között, valamint a mesterséges endotoxin tolerancia állapotában (Lázár jr. és mtsai, 1990 a, b; 1992 a).

A macrophagok TNF termelésének legerősebb ingere a bakteriális endotoxin (Michie és mtsai, 1988). A legújabb kutatások bizonyították, hogy endotoxin és szeptikus sokkban, eddig az endotoxinoknak tulajdonított szöveti

károsodásokért elsősorban a TNF felelős (Tracey, 1991). Tekintettel arra, hogy a glükokortikoid hormonok gátolják a macrophagok TNF termelését (Beutler és mtsai, 1986), érdekesnek láttuk megvizsgálni, hogy a glükokortikoid antagonist RU 38486, hogyan befolyásolja az endotoxin indukálta TNF produkciót kísérleti állatban és szövettényészetben (Lázár Jr. és mtsai; 1991; 1992 b,c). Egy speciálisan transzformált, humán TNF termelésére képes sejtvonal segítségével vizsgálni kívántuk az RU 38486 hatását a humán TNF toxicitására *in vivo* és *in vitro* körülmények között (Lázár Jr. és mtsai, 1992c).

A glükokortikoidok számos érési, fejlődési folyamatban is elengedhetetlenül szükségesek. Szerepüket a foetális életben, a tüdő fejlődésében már igen korán felismerték (Liggins, 1969). Későbbi tanulmányok egyértelműen igazolták, hogy koraszülöttekben a tüdő surfactant hiányával járó respiratory distress syndrome megelőzhető glükokortikoid hormonok adásával. Ezzel szemben felnőtt korban, a glükokortikoidok kedvező hatása a septicus sokkban kialakuló ARDS kezelésében napjainkban is ellentmondásos (Murrey és mtsai, 1988).

Másrészt régóta ismert, hogy újszülött kísérleti állatban glükokortikoidok nagy dózisával az állat súlyos leromlásával járó wasting szindróma idézhető elő (Schlesinger és Mark, 1964; Fachet és Stark, 1969; Szilágyi és Lázár, 1978). Az RU 38486-ot sikeresen alkalmazzák felnőtt korban a glükokortikoid túlsúllyal járó megbetegedések (pl.: Cushing kór) kezelésében (Philibert, 1984; Nieman és Loriaux, 1987). Kíváncsiak voltunk arra, hogy az RU 38486 befolyásolja-e az újszülöttkori wasting szindróma kialakulását (Lázár Jr. és mtsai, 1992d).

Jól ismert a Kupffer-sejtek szerepe a szervezet aspecifikus védekező mechanizmusában. Nagy funkcionális kapacitásuk révén nemcsak az

intravascularis clearanceben döntő jelentőségűek, hanem anatómia helyzetük folytán stratégiailag fontos szerepet töltenek be a portális keringésbe jutott antigén természetű anyagok, bakteriális termékek kiszűrésével és közömbösítésével (Crofton és mtsai, 1978). A macrophagok, különösen a máj Kupffer-sejteinek aktivációja, a destruktív és immunosuppresszív macrophag-produktumok túlzott felszabadulása hozzájárulhat súlyos sokk állapotokban a szervek működésének összeomlásához, az ún. "multiple organ failure" kialakulásához (Border, 1988). A májnak ebben a folyamatban komoly jelentőséget tulajdonítanak. A máj, elsősorban a Kupffer-sejtek működésének megszűnése révén, szabad utat enged a bélből felszívódó toxikus anyagoknak. A bakteriális endotoxinok keringésbe jutása jelentősen hozzájárul a sokk irreverzibilissé válásához (Schoeffel és mtsai, 1989).

A macrophag vagy más néven reticuloendothelialis rendszer (Reticuloendothelialis System, RES) granulopexiás aktivitásának csökkentése a rendszer élettani és kórélettani szerepével foglalkozó kutatások egyik régi törekvése. Az úgynevezett RES-deprimáló, vagy más néven RES-blokkoló szerek között a legkülönbözőbb fiziko-kémiai tulajdonságú anyagok találhatók, mint pl. kolloidok (Jaffe, 1931, Jancsó, 1955), szteránvázas vegyületek, mint a kortizon (Bilbey és Nicol, 1958), zsírsavészterek, mint a metilpalmitát (Di Luzio és Woole, 1964), a nagymolekulasúlyú dextránszulfát (Bradfield és mtsai, 1977), az újabban igen gyakran használt, a macrophagokra specifikusan cytotoxikus hatásúnak tartott silica (Allison és mtsai, 1966) és a tengeri növényekből előállított, nagymolekulasúlyú poligalaktóz szulfát, a karragenin (Catanzaro és mtsai, 1971), mely a lysosomális membrán destabilizációja révén szelektív módon károsítja a máj Kupffer sejtjeit. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai szerint a ritkaföldfémek, köztük a gadolinium klorid ($GdCl_3$), jelentősen gátolja a reticuloendothelialis rendszer működését (Lázár, 1973) és a

hatásért fény- és elektronmikroszkópos, valamint izotóp teszt-anyagokkal végzett vizsgálatok szerint (Husztik és mtsai, 1980) a Kupffer-sejtek csökkent phagocytá működése tehető felelőssé. A módszert a nemzetközi irodalom is átvette és segítségével más kutatócsoportok is igazolták a Kupffer-sejtek jelentőségét immunológiai folyamatokban (Person és mtsai, 1986; Gogenheim és mtsai, 1988; Calery és mtsai, 1989; Kamei és mtsai, 1990). Mindezek alapján érdemesnek láttuk megvizsgálni egyrészt a $GdCl_3$ hatását a kísérletes szeptikus sokk lefolyására (Lázár jr. és mtsai, 1984, 1986, 1987), másrészt a karrageninnel, valamint a $GdCl_3$ -al létrehozott reticuloendothelialis blokáddal segítségével, vizsgálni kívántuk a máj szerepét az endotoxin érzékenységben, az endotoxin eloszlásában, valamint a TNF termelésben (Lázár Jr. és mtsai, 1992c). Hasonlóképpen ígéretesnek tűnt megvizsgálni a $GdCl_3$ és a karragenin hatását a TNF termelésre és toxicitásra *in vitro* körülmények között is.

CÉLKITŰZÉSEK, A KUTATÁSOK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

1. Az új glükokortikoid antagonistá az RU 38486 segítségével vizsgálni kívántuk egyrészt az endogén glükokortikoidok szerepét az endotoxin és szeptikus sokkal szembeni rezisztencia megőrzésében és az endotoxin tolerancia fenntartásában, másrészt az RU 38486 hatását a kísérletes wasting szindrómára. Ezzel kapcsolatosan az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

a) Befolyásolja-e az antiglükokortikoid RU 38486 a kísérleti állatok rezisztenciáját a bakteriális endotoxin és a -- caecum lekötésével és perforációjával kiváltott -- szeptikus sokk letális hatásával szemben?

b) Megváltoztatja-e az RU 38486 az endotoxin előkezeléssel endotoxin toleránssá tett kísérleti állatok rezisztenciáját endotoxin és szeptikus sokkal szemben?

c) Milyen hatása van az RU 38486-nak az endotoxin/szeptikus sokk kulcsfontosságú mediátorának, a TNF-nek, a termelésére és toxicitására *in vitro* és *in vivo* körülmények között?

d) Befolyásolja-e az RU 38486 a kísérletes újszülöttkori wasting szindróma kialakulását?

2. Az értekezés másik fő célkitűzése annak a kérdésnek a vizsgálata volt, hogy a reticuloendothelialis rendszer egyik legnagyobb funkcionális kapacitással rendelkező sejtjeinek, a Kupffer-sejtek működésének felfüggesztése, milyen hatást vált ki endotoxin és kísérletes szeptikus sokk körülményei között. Ezzel kapcsolatosan az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

a) Hogyan befolyásolja a GdCl_3 -dal kiváltott Kupffer-sejt phagocytosis blokádnak a kísérletes szeptikus sokk lefolyását?

b) Hogyan befolyásolja a GdCl_3 -dal és a karrageninnel kiváltott Kupffer-sejt phagocytosis blokádnak az endotoxin szöveti eloszlását, az endotoxin érzékenységet és a TNF termelést?

A kísérletek gyakorlati jelentőségét abban látjuk, hogy az eredmények közelebb visznek a szeptikus sokk patofiziológiájának, a glükokortikoid hormonok által mediált mechanizmusok és a macrophagok élettani, kórélettani szerepének jobb megismeréséhez, továbbá ezen ismeretek perspektivikusan segítséget nyújthatnak kedvező terápiás effektusok eléréséhez.

KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkben CFLP és NMRI 30-35g-os hím egereket (LATI), valamint R-Amsterdam vagy Wistar 200-220g-os, hím és nőstény patkányokat (LATI) használtunk. A kísérleti állatok ad libitum csap vizet és LATI tápot fogyasztottak.

2. Kísérleti anyagok

RU 38486 (Roussel Uclaf, Franciaország)

Methylprednisolon (Orion, Finnland)

Hydrocortison (Kőbányai Gyógyszerárugyár, Budapest)

GdCl₃ (ICN-K and K Laboratories, Plainview, New York)

Carragenan (kappa, lambda, iota), (Marine Colloid, Rochland)

Nembutal (Abbot Laboratories)

Escherichia coli 026:B6 lipopolosaccharid B (Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA)

Tuskészítmény (C11/1531a, Gunther Wagner, Hannover)

Na₂Cr⁵¹0₄ (MTA Izotop Intézet)

L- phosphatidyl choline (Sigma Chemical Company)

cholesterol (Sigma Chemical Company)

3. Kísérleti módszerek

Endotoxin tolerancia előidézése

Egerekben az endotoxin tolerancia előidézésére az *E. coli* 026:B6 lipopoliszacharid B-t 5, 5, 10, 10, 20, 20 μg mennyiségben (0,2 ml fiziológiás sóoldatban) i.p. adagoltuk 6 napon keresztül. A kísérletet 48 órával az utolsó endotoxin injekció után végeztük.

Patkányokban az endotoxin tolerancia előidézésére az endotoxint intravénásan adtuk, 50 illetve 75 $\mu\text{g}/100$ g testsúly dózisban, a kísérlet előtti 6. illetve 4. napon.

Szeptikus sokk előidézése

Az irodalomban ajánlott számos szeptikus sokk modell közül Wichterman és munkatársai (1980) által patkányokra leírt, a caecum lekötésén és perforációján alapuló akut peritonitis kísérleti modelljét alkalmaztuk, melyet egerekre is adaptáltunk (1. ábra). A Nembutál altatásban, középső medián laparotomiából feltárt hasfalon keresztül a caecumot óvatosan előemeltük. A colon ascendensből a béltartalmat enyhe nyomással a caecum felé préseltük, hogy azt a béltartalommal feltöltsük, majd a caecumot közvetlenül az ilocaecalis billentyű alatt úgy kötöttük le, hogy a bél folytonosságát ne szakítsuk meg. Ezt



1. Ábra

A szeptikus sokk előidézésének műtéti technikája

követően a caecum antemesenterialis felszínén két tűszúrást ejtettünk, és a belet visszahelyezve a hasüregbe, a hasfalat két rétegben zártuk.

A műtét után az állatok látszólag egészséges állatokhoz hasonlóan viselkedtek: folyadékot fogyasztottak, tisztálkodtak, majd fokozatosan súlyos betegség tünetei fejlődtek ki: az állatok keveset mozogtak, nem tisztálkodtak, nem bújtak össze, szőrüket borzolták, környezetükkel szemben közömbössé, letargikussá váltak. A műtétet követő 24. órában levett vérből elvégzett mikrobiológiai (bakteriológiai) vizsgálat szerint az állatokban bacteriaemia fejlődött ki: az állatok véréből *Escherichia coli* és *Streptococcus faecalis* tenyésztett ki.

Baker és munkatársai (1983) megfigyelésével összhangban a módszer jól standardizálható, és a caecum lekötéséhez használt tű átmérőjének változtatásával a letalitás a kívánalmaknak megfelelően változtatható.

Reticuloendothelialis blokádnak előidézése

Reticuloendothelialis blokádnak előidézésére gadolinium kloridot és kappa, lambda vagy iota karragenint használtunk. A gadolinium kloridot (2mg/ml koncentrációban, fiziológiás sóoldatban) intravénásan (1mg/100g testsúly dózisban), a kappa, lambda vagy iota karragenint (10 mg/ml koncentrációban, fiziológiás sós vízben oldva) intraperitoneálisan (5mg/100g testsúly dózisban) 24 órával az endotoxin beadása vagy a szeptikus sokk kiváltása előtt adtuk.

RES aktivitás meghatározása

A reticuloendothelialis rendszer granulopexiás aktivitásának meghatározására Biozzi és munkatársai (1951) tus-clearance módszerét alkalmaztuk. A vizsgálatokhoz pelikán tuskészítményt használtunk, melyből 1% zselatint és 16 mg/ml tust tartalmazó oldatot készítettünk. Az állatok 8-16 mg/100g testsúly dózisban koloidális tus-szuszpenziót kaptak intravénásan. A retroorbitális plexusból levett vérminták tus koncentrációját 675 nm hullámhosszon fotometriásan mértük. A tus koncentráció logaritmusából az idő függvényében kiszámítottuk a globális phagocytá-index (K) értékét az alábbi képlet segítségével:

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

A képletben a C₁, illetve C₂ a tus koncentrációját jelenti T₁, illetve T₂ időben. A reticuloendothelialis szervfrakció értékeket Cr⁵¹-el jelzett idegen vörösvértestek és Cr⁵¹-el jelzett endotoxin segítségével határoztuk meg. Az emberi O vércsoportú, Rh negatív vörösvértestek jelölését Gray és Sterling módszere (1950) szerint végeztük. A jelöléshez Na₂Cr⁵¹O₄-et használtunk. A vértartósító oldatban (összetétel: natrium citricum 20 g, dextroz 30 g, acidum citricum 5,1 g, deszt. viz ad 1000 ml) tárolt vörösvértest üledékhez nátrium-kromátot adtunk (20 μCi/ml vörösvértest üledék arányában). A vörösvértest keveréket 45 percig szobahőn inkubáltuk, közben többször megkevertük, majd fiziológiás sóoldattal többszörösen (3-4x) mostuk. Az E. coli 026:B6 Lipopolysaccharid B a Cr⁵¹-el történő jelölését Braude és munkatársai (1955), illetve Chedid és munkatársai (1966) szerint végeztük. 20 mg endotoxint 4 ml fiziológiás sóban szuszpendáltunk és 150 μCi Na₂Cr⁵¹O₄-al 24 óráig 37°C-on

inkubáltunk, majd dializáló hüvelybe helyezve, 4°C-on fiziológias sóoldattal szemben dializáltuk a dializáló folyadék többszöri cseréjével, amíg a dializátum radioaktivitása a háttérrel azonos aktivitást mutatott. A jelölt vörösvértestek, illetve endotoxin intravénás injekciója után 1 órával az állatokat leöltük, és a különböző szerveket lemértük. A vér, valamint az egyes szervekből vett minták radioaktivitását gamma-számlálóban (Gamma, Budapest) mértük. Az eredményeket az injiciált radioaktivitás százalékában, az egész szervek súlyára adtuk meg.

Multilamelláris liposoma készítése

A multilamelláris liposomát Van Rooijem és Van Nieuwmegen (1984) módszere szerint preparáltuk. 56,25 mg foszfatidilkolint, 7,25 mg koleszterint, valamint 15 mg RU 38486-ot oldottunk chloroform:methanol 1:1 arányú keverékében (az üres liposoma RU 38486-ot nem tartalmazott). Az organikus fázist 500 ml-es gömbalakú lombikban rotációs vákuum-bepárlóban 37 °C-on elpárologtattuk, mely műveletet 10 ml chloroformban történő oldás után egyszer megismételtünk. A lombik falán finom film formájában kitapadó lipid réteget 3 ml 7,4 pH-jú 0,1 M-os phosphat-puffer-sósvízben szobahőmérsékleten szuszpendáltunk üveggyöngyök és vortex segítségével (10-szer 1 perces vortex kezelés, 1 perces szünetek közbeiktatásával). Ezután a preparátumot 1 percig szonifikáltuk. A kész liposoma szuszpenziót +4 °C-on maximum 2 napig tároltuk.

Az újszülöttkori wasting szindróma előidézése

Az újszülött patkányok (Wistar) a megszületésüket követő első napon 0,5 mg hydrocortisont kaptak subcutan. A hydrocortison adása után az újszülött patkányokon wasting szindróma tipikus állapota alakult ki, mely az alábbi tünetegyüttesből állt: rossz fizikai állapot, súlynövekedés elmaradása, vékony, ráncos bőr, elégtelen szőrnövekedés, hasmenés, és az állatok jelentős százalékanak elhullása.

Tumor nekrosis faktor klónozása és termelése

A TNF- α (humán tumor nekrosis faktor alfa, cachectin) gént humán géntárból izoláltuk. A *MspI-EcoRI* fragmentet, mely kb 80 %-át kódolja a TNF gén negyedik exonjának, a fehérje hiányzó N terminális részét kódoló 102 bp szintetikus oligonukleotiddal ligáltuk. Az így létrehozott gén konstrukciót a pDR540 expressziós vektor (Pharmacia Fine Chemicals) *BamHI* helyére klónoztuk. Az *E. coli* sejtek, melyek a fenti plazmidot tartalmazzák, kb 1 mg rekombináns hTNF termelésére képesek LB tápfolyadékban 1 liter kultúra esetén (Tóth és mtsai, 1988).

A természetes emberi tumor nekrosis faktor (alfa)-t HeLa sejtéből származó M9 humán epithelialis tumor sejtekkel termeltettük. E sejteket korábban egy olyan DNS konstrukcióval transzformáltuk, amelyben az emberi TNF gén kifejeződést az SV40 majom tumorvirus rendkívül erős enhancer-promoter szekvenciája szabályozza. Ezen sejtek kb 10^4 - 10^5 U TNF (1 millió sejt/nap) termelésére képesek Dulbecco által módosított MEM-ben (Mai és mtsai, 1990).

Tumor nekrosis faktor tisztítása és meghatározása

Mind a természetes, mind a rekombináns TNF-et CPG (kontrolált porusú üveggyöngy) és Mono-Q FPLC kromatográfiás lépésekből álló tisztítási eljárással nyertük. Ha szükséges volt, az LPS nyomait Polymyxin B-agarózon végzett affinitás kromatográfiával távolítottuk el. A végső termék egy 17 kD tömegű alegységekből álló, >95%-os tisztaságú fehérje volt, mely specifikus aktivitása legalább 20 millió U/mg és LAL-Pyrogen assay-vel vizsgálva (Wittaker Bioproducts, Walkersville, MD) kevesebb mint 0.125 U/mg endotoxint tartalmazott.

A TNF meghatározását egér L929 sejteken végzett, cytotoxicitason alapuló biológiai tesztet végeztük (Actinomycin D jelenlétében, 37 C fokon) (Carswell és mtsai, 1975; Aggarwal és mtsai, 1985). A sejtek pusztulását neutrál vörös vitális festék felvétele alapján határoztuk meg. Egy U TNF félmaximális cytotoxikus hatásnak felel meg.

A szervekből (máj, lép) vett mintákat ultrahangos feltárást követően centrifugáltuk, a membrán frakciót eltávolítottuk, majd reszuspendáltuk. A TNF aktivitását a supernatansból és a membránfrakcióból is meghatároztuk. Ez a TNF koncentráció az egyes szervek sejtes elemei (Kupffer sejtek, T és B lymphocyták, granulocyták, NK sejtek, stb) által termelt, illetve a szervekben lévő vér, nyirok és egyéb szöveti nedvek TNF tartalmának összességét jelentik.

Sejt tenyésztés

A kísérleteinkben használt sejteket (L929, M9, 3T3, P388) 5% foetális borjúsavót tartalmazó, Dulbecco által módosított MEM-ben, 37 C-on, 5% CO₂ mellett tenyésztettük.

Statisztikai analízis

Az adatok és a probléma természetétől függően különböző statisztikai módszereket alkalmaztunk.

A várható értékek összehasonlítására:

- (1) egymintás és kétmintás t próba Bonferroni módszerével
- (2) variancia analízis (többszörös összehasonlítások Scheffé módszerével)

A gyakorisági eloszlások (túlélési adatok):

- (1) chi-négyzet próba Yates korrekcióval
- (2) Fisher próba

Az összefüggések vizsgálatára:

- (1) regressziós analízis
- (2) Friedman próba

KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

1. Az RU 38486 hatása a kísérletes szeptikus és endotoxin sokk lefolyására

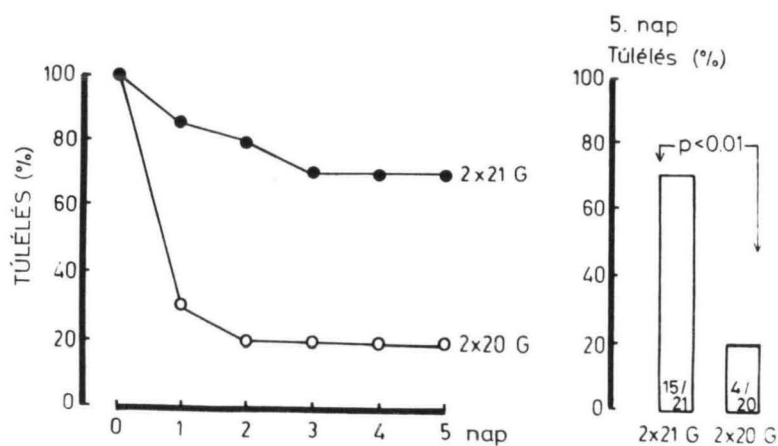
Baker és munkatársai (1983) megfigyelésével összhangban a caecum lekötésével és perforációjával kiváltott szeptikus peritonitis illetve szeptikus sokk modell jól standardizálható és a caecum perforációjára használt tű átmérőjének változtatásával a mortalitás mértéke a kívánalmaknak megfelelően változtatható (2. ábra). Az ábrából látható, hogy 21G-s tű alkalmazása esetén az 5. napon a túlélés 75%, míg a nagyobb, 20G-s tű esetében 20% volt. A módszer így alkalmas arra, hogy mind a szeptikus peritonitis illetve a szeptikus sokk lefolyását súlyosbító, mind pedig a rezisztenciát növelő anyagok hatását vizsgálhassuk.

Vizsgálataink szerint, mint ahogyan a 3. ábra mutatja, az endotoxin előkezeléssel endotoxin toleránssá tett egerek rezisztenciája a szeptikus sokk letalitásával szemben jelentősen fokozódott. A kontroll állatok csoportjában -- 20G-s injekciós tűt használva a caecum perforációjára -- az állatok mindössze 20%-a élte túl a műtétet követő 5. napot és 70%-uk már az első 24 órában elpusztult, az endotoxin toleráns állatok esetében azonban 90%-os túlélést tapasztaltunk.

Vizsgálataink szerint az RU 38486 mind a kontroll, mind pedig az endotoxin toleráns egerek rezisztenciáját jelentősen csökkentette a szeptikus sokk letalitásával szemben (4. ábra). 21G-s tűt használva a caecum perforációjára, a kontroll állatok csoportjában a 71%-os túlélés a glukokortikoid

antagonista előkezelés hatására 15%-ra csökkent. Az endotoxin toleráns állatok esetében az állatok túlélése növekedett (90%), de az RU 38486 ezen állatok csoportjában is jelentősen csökkentette az állatok túlélését (33%).

Az RU 38486 jelentősen csökkentette az endotoxin előkezeléssel kiváltott endotoxin toleranciát is (5. ábra). 600 μ g endotoxin beadását követően a kontroll csoportban 60%-os, míg az endotoxin toleráns csoportban 95%-os túlélést észleltünk. Ha az endotoxin toleráns egerek az endotoxin sokk kiváltása előtt RU 38486 előkezelésben is részesültek, az állatoknak mindössze 5%-a maradt életben. Az ábra azt is szemlélteti, hogy az RU 38486, dózis-dependens módon növeli az állatok érzékenységet az endotoxin letális hatásával szemben. RU 38486, a vizsgálatainkban alkalmazott dozírozás mellett (1mg) sem 6, sem 12 óra múlva nem befolyásolta a reticuloendothelialis szervfrakció értékeit (6. ábra).



2. Ábra

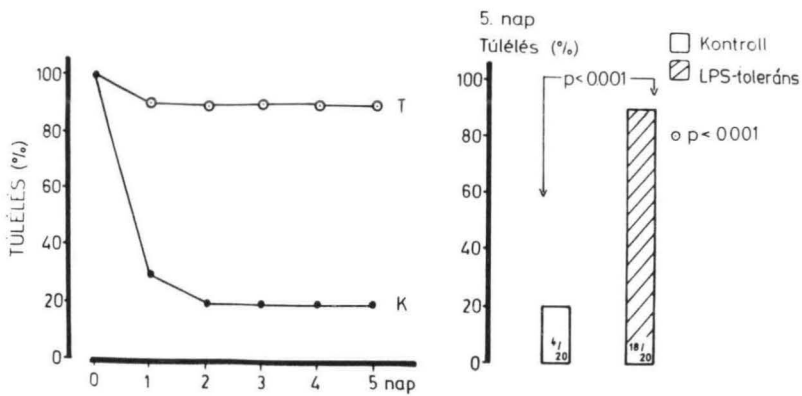
Szeptikus sokk hatása a kísérleti állatok túlélésére

A caecum perforációjára különböző átmérőjű tűt használtunk.

2x21 = két tűszúrás 21G-s tűvel

2x20 = két tűszúrás 20G-s tűvel

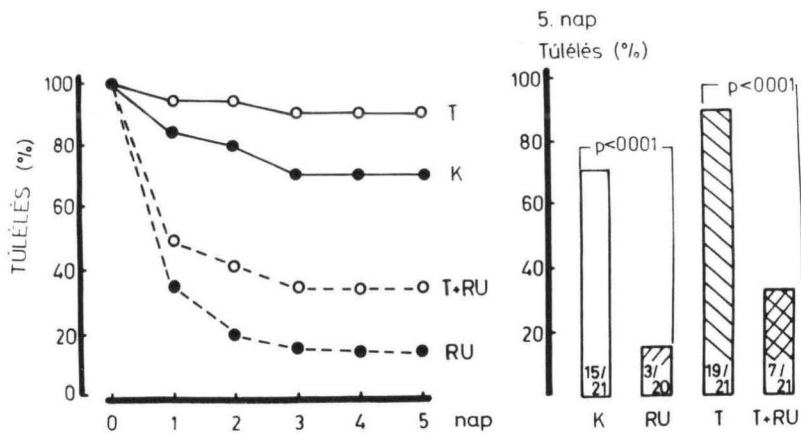
Az oszlopdiagrammon feltüntetett számok az él/összes állat számát jelzik az egyes csoportokban.



3. Ábra

Az endotoxin tolerancia hatása szeptikus sokkban az állatok túlélésére

Mind a kontroll, mind az endotoxin toleráns állatok üres liposomát kaptak a szeptikus sokk/peritonitis kiváltása előtt. A caecum perforációját 20 G-s tűvel végeztük. Az endotoxin tolerancia előidézésére az állatok *E. coli* 026-B26 lipopolisaccharid B-t kaptak 5, 5, 10, 10, 20, 20 μg mennyiségben intraperitoneálisan 6 napon keresztül. A szeptikus sokk kiváltását 48 órával az utolsó endotoxin injekciót követően végeztük. Az oszlopdiagrammon feltüntetett számok az él/összes állat számát jelzik az egyes csoportokban.

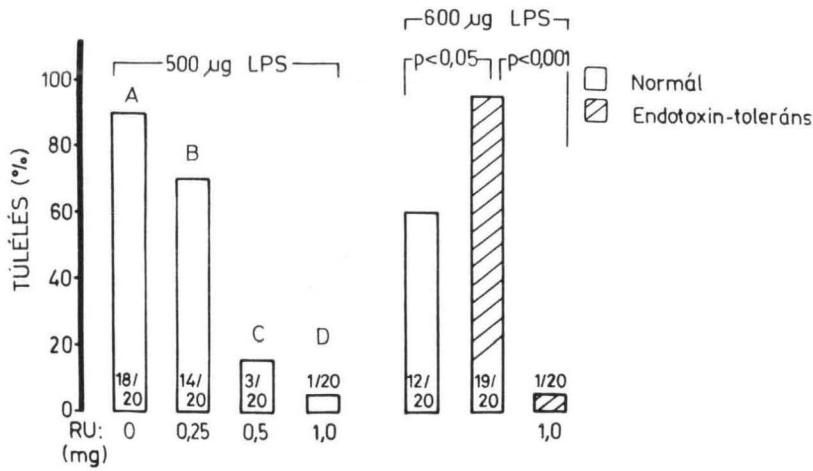


4. Ábra

RU 38486 hatása a túlélésre szeptikus sokkban normál és endotoxin toleráns egerekben

A kontroll (K) és endotoxin előkezeléssel endotoxin toleránssá tett egerek (T) üres liposomát vagy liposomába zárt RU 38486-ot (1mg) kaptak intravénásan közvetlenül a szeptikus sokk kiváltása előtt. A caecum perforációját 21G-s tűvel végeztük.

Endotoxin tolerancia előidézése: lásd 3. ábra magyarázatát. Az oszlopdiagrammon feltüntetett számok az él/összes állat számát jelzik az egyes csoportokban.

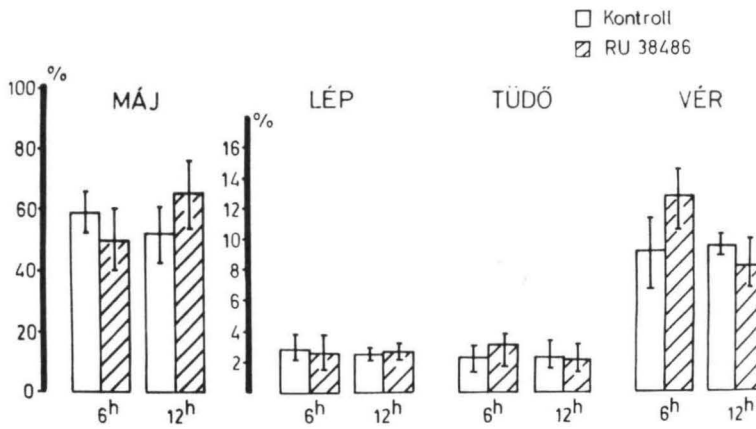


5. Ábra

RU 38486 hatása az endotoxin érzékenységre normál és endotoxin toleráns egerekben

A kísérleti egerek (A, B, C, D) LPS-t (500 µg, ip.) és különböző dózisú (0.25, 0.5, 1.0 mg, iv.) liposomába zárt RU 38486-ot (RU) kaptak. (bal oldal)

A másik csoportban (jobb oldal) a normál és az endotoxin előkezeléssel endotoxin toleránssá tett állatok LPS-t (600 µg, ip.), vagy LPS-t és liposomába zárt RU-t (1 mg, iv.) kaptak. A túlélők számát a kezelést követően 48 órával rögzítettük. Az oszlopdiagrammon feltüntetett számok az él/összes állat számát jelzik az egyes csoportokban.



6. Ábra

RU 38486 hatása a reticuloendothelialis rendszer szervfrakció értékeire

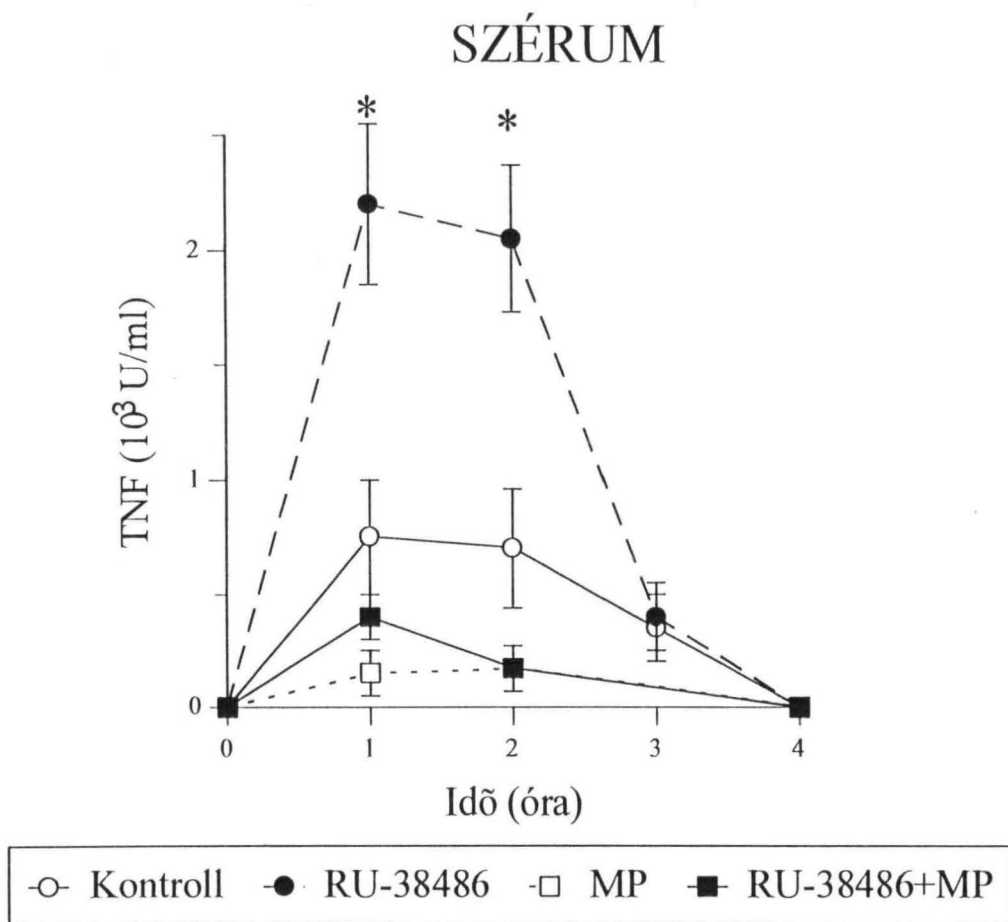
Az állatok üres liposomát vagy liposomába zárt RU 38486-ot (1 mg, iv.) kaptak közvetlenül a Cr^{51} -el jelölt LPS (200 μg , iv.) beadása előtt. A különböző szervek aktivitását 6 és 12 óra múlva határoztuk meg. Az értékek tíz mérés átlagát mutatják.

2. Az RU 38486 hatása a TNF termelésre

Állatkísérleteinkben megvizsgáltuk az RU 38486 hatását az endotoxin-indukálta TNF termelésre.

Az RU 38486 előkezelésen átesett állatokban, összehasonlítva a kontroll és a methylprednisolon-kezelt állatok adataival, szignifikánsan emelkedett a TNF termelés mind a szérumban, mind a májban és a lépben (7., 8. és 9. ábra). A methylprednisolon szignifikánsan csökkentette az endotoxin indukálta TNF termelést (szérumban, májban), valamint felfüggesztette az RU 38486 potenciózó hatását a TNF termelésre (7., 8. és 9. ábra).

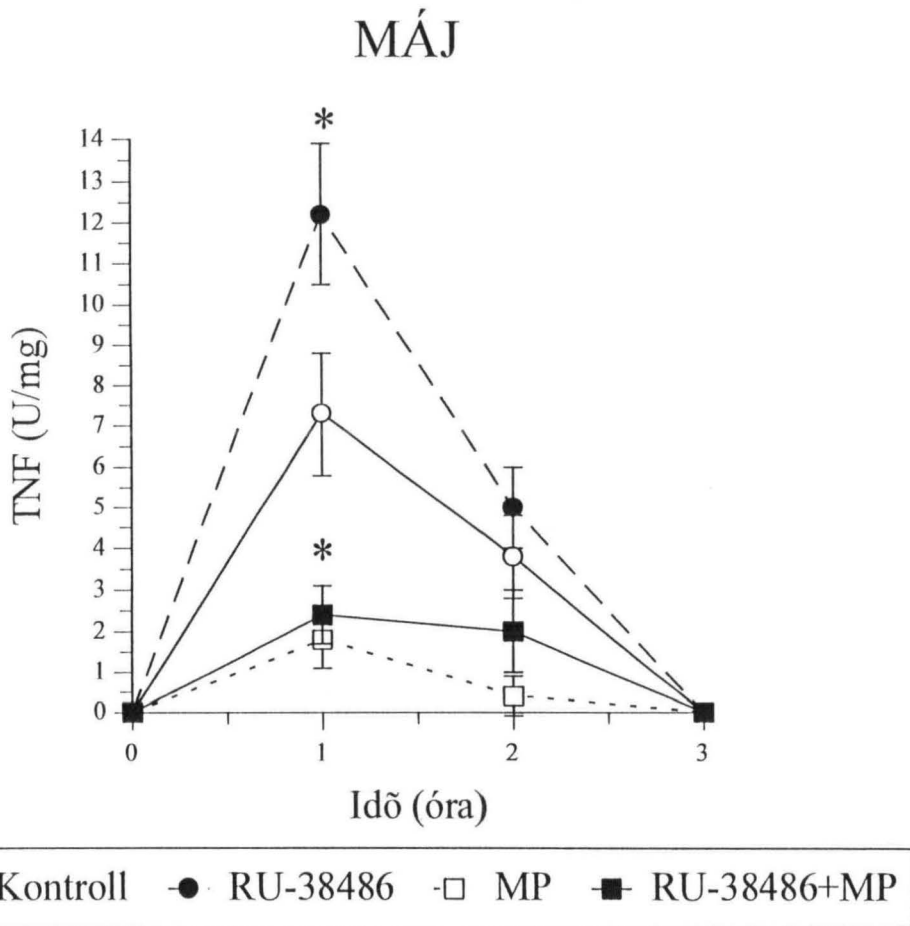
In vitro vizsgálatainkban a genetikai transzformáción átesett, hTNF termelésre képes M9 sejtek TNF termelése közel háromszorosára emelkedett az antiglikokortikoid, RU 38486 jelenlétében (10. ábra). Továbbá kimutattuk azt is, hogy az RU 38486 TNF szintézist képes indukálni a P388 myeloid tumor sejtekben (10. ábra). Ezen sejtek LPS, TNF vagy forbol észterek jelenléte nélkül nem termelnek TNF-t.



7. Ábra

Az RU 38486 hatása az endotoxin indukálta TNF termelésre a szérumban

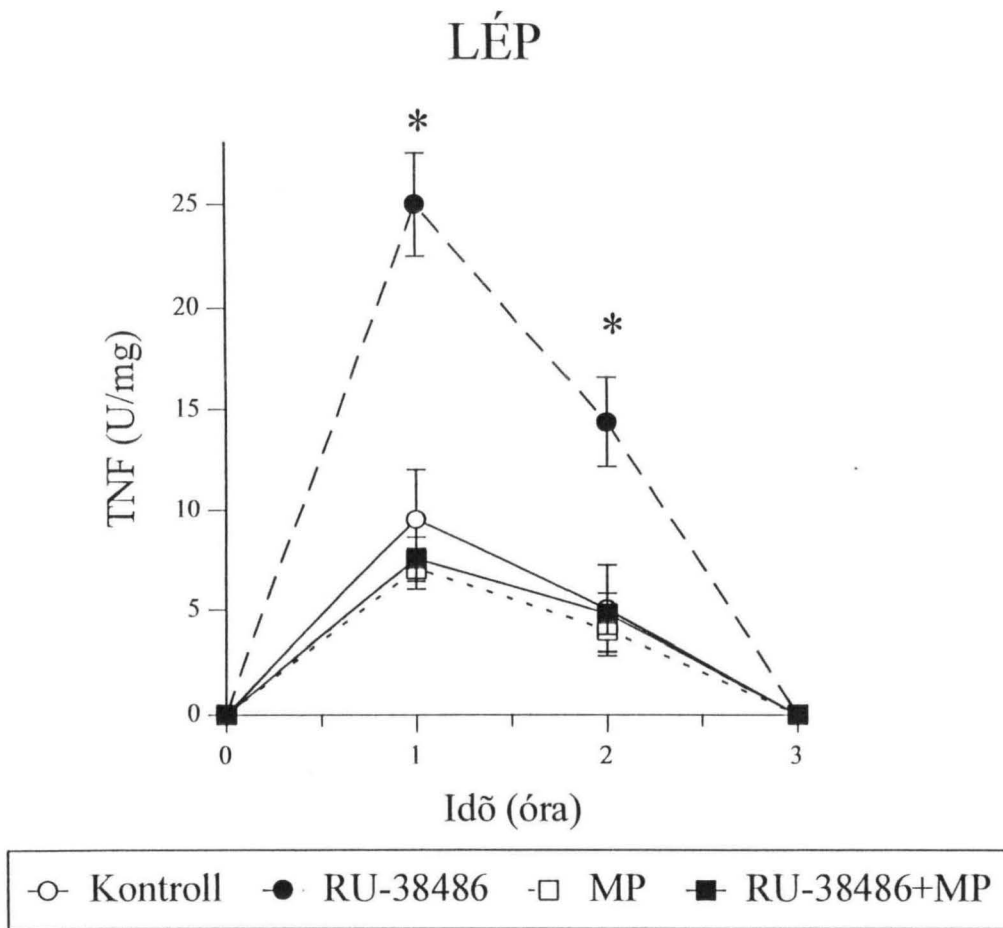
Az állatok üres liposomát (K), liposzómába zárt RU 38486-ot (1 mg), methylprednisolont (MP) (2 mg) vagy RU 38486 (RU)-ot és MP-t kaptak intravénásan közvetlenül az endotoxin beadása előtt (1 µg/g,iv.). A TNF aktivitását 1, 2, 3 és 4 órával az LPS beadását követően határoztuk meg. A középértékeket minden időpontban 10 mérés alapján számítottuk ki. (* p < 0.05).



8. Ábra

Az RU 38486 hatása az endotoxin indukálta TNF termelésre a májban

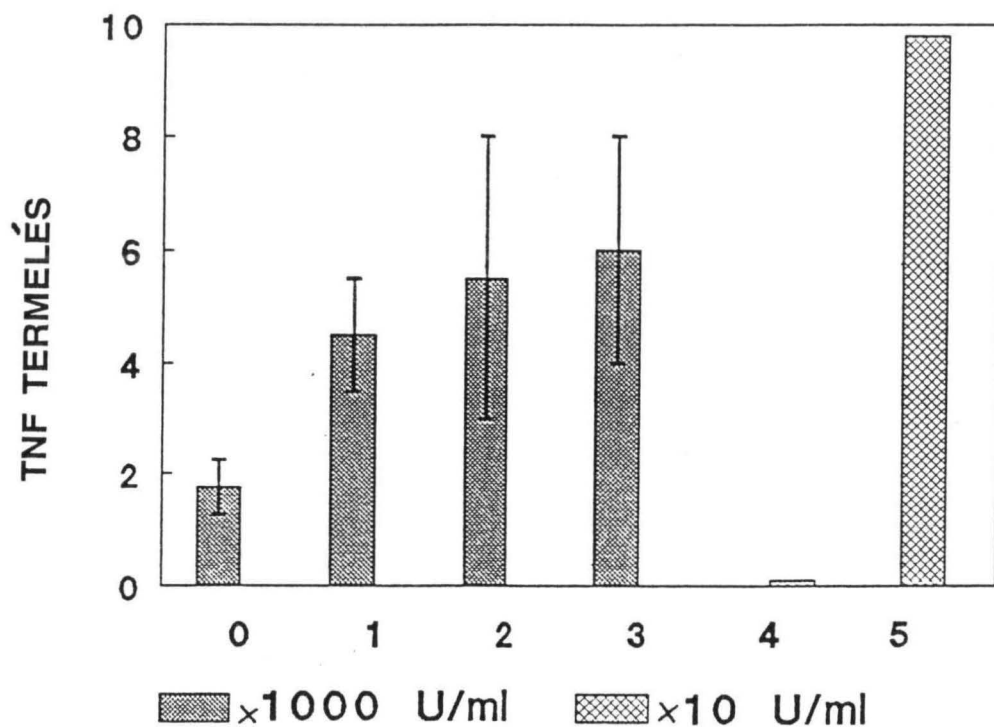
Magyarázat: lásd 7. ábrát



9. Ábra

Az RU 38486 hatása az endotoxin indukálta TNF termelésre a lépben

Magyarázat: lásd 7. ábrát



10. Ábra

Az RU 38486 hatása az M9 és P388 sejtek TNF termelésére

Az ábra a sejtek (10^6 sejt/ml) 24 órás TNF termelését mutatja. A sejteket (M9, P388) liposomába zárt, különböző dózisú RU 38486-al (RU) illetve üres liposomával kezeltük.

0 = M9 sejtek RU kezelés nélkül

1, 2, 3 = M9 sejtek 6, 20 és 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RU jelenlétében

4 = P388 sejtek, RU kezelés nélkül

5 = P388 sejtek, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RU jelenlétében

3. Az RU 38486 hatása a hTNF toxicitására

Kísérleteink szerint az RU 38486 nemcsak a TNF termelést, hanem a TNF toxikus hatását is jelentősen fokozta mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között.

Egerekben a humán TNF-nek, a vizsgálatainkban alkalmazott dózírozásban, letális hatása nem volt. Az irodalomból jól ismert, hogy az emberi TNF rágcválókban kevésbé toxikus (Brouckaert és mtsai, 1992). Ennek oka, hogy az emberi TNF csak az egyik egér TNF receptorhoz kötődik, míg az egérben termelődő murine TNF mindkettőhöz (Brouckaert és mtsai, 1992). A humán TNF hatása egérben jelentősen fokozható kis mennyiségű, egyebekben ártalmatlan bakteriális endotoxinnal (Rothstein és Schreiber, 1988).

Egérkísérleteinkben az RU 38486 szignifikánsan fokozta a TNF toxicitását LPS-sel kombinálva vagy LPS adása nélkül is (30% illetve 100%-os mortalitás, I Táblázat).

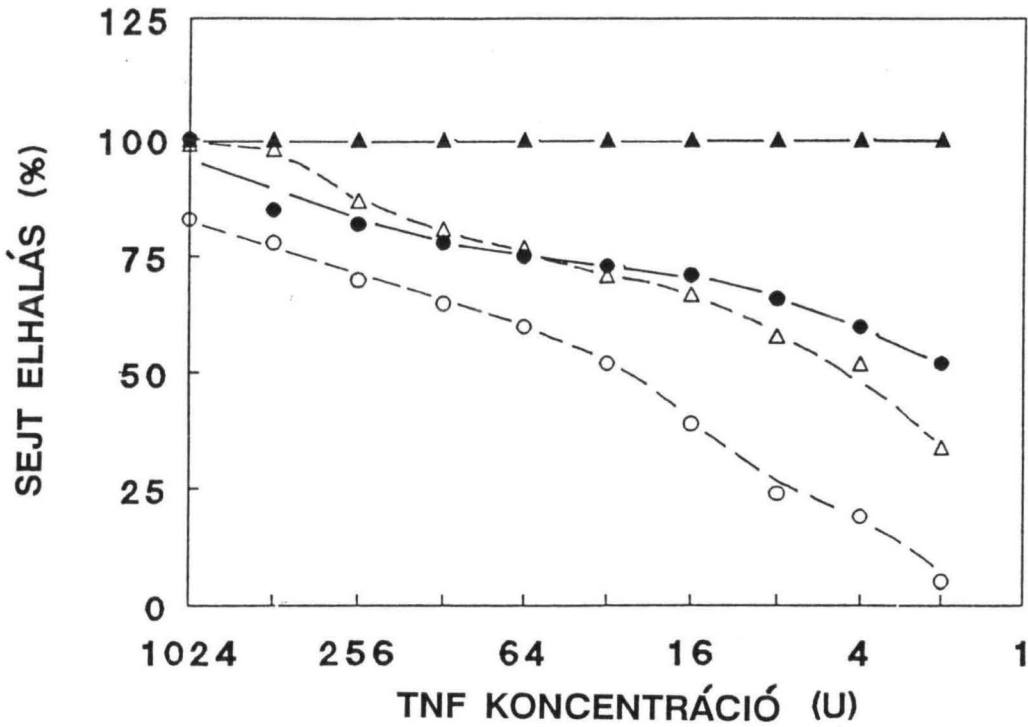
Az RU 38486 jelentősen fokozta a hTNF toxikus hatását *in vitro* sejtenyészetben is. Az L929 sejtek TNF érzékenysége antiglükokortikoid jelenlétében jelentősen fokozódott (a sejtek háromszor alacsonyabb TNF koncentráció mellett is elpusztultak). Továbbá kimutattuk, hogy a TNF-fel szemben rendkívül rezisztens 3T3 egér fibroblast sejtek RU 38486 hatására TNF rezisztenciájukat részben elvesztették (11. ábra).

Kezelés	él\össz.	mortalitás (%)	statisztika
TNF	20\20	0	
LPS	20\20	0	
TNF+LPS	16\20	20	3 vs 1 NS
TNF+RU	14\20	30	4 vs 1 p<0.005
LPS+RU	20\20	0	5 vs 2 NS
TNF+LPS+RU	0\20	100	6 vs 3 p<0.001
TNF+LPS+RU+MP	14\20	30	7 vs 6 p<0.001

I.Táblázat

Az RU 38486 hatása hTNF letális hatására

Az állatok LPS (1 µg/g), TNF (2 µg/10g), RU 38486 (1 mg) és MP (2 mg) intravénás kezelésben részesültek. A túlélők számát a kezelést követően 48 órával rögzítettük. (*p<0.001)



11. Ábra

Az RU 38486 hatása a 3T3 sejtek TNF érzékenységre

A sejteket liposomába zárt RU 38486-al (RU, 40 µg/ml) illetve üres liposomával kezeltük a különböző koncentrációjú TNF tesztelés előtt. A sejtek TNF érzékenységét actinomycin D (0,125 vagy 0,25 µg/ml) jelenlétében vizsgáltuk.

- (▲) 0.25 µg/ml actinomycin D + RU
- (●) 0,125 µg/ml actinomycin D + RU
- (△) 0,25 µg/ml actinomycin D
- (○) 0,125 µg/ml actinomycin D

4. Az RU 38486 hatása a kísérletes újszülöttkori wasting szindrómára

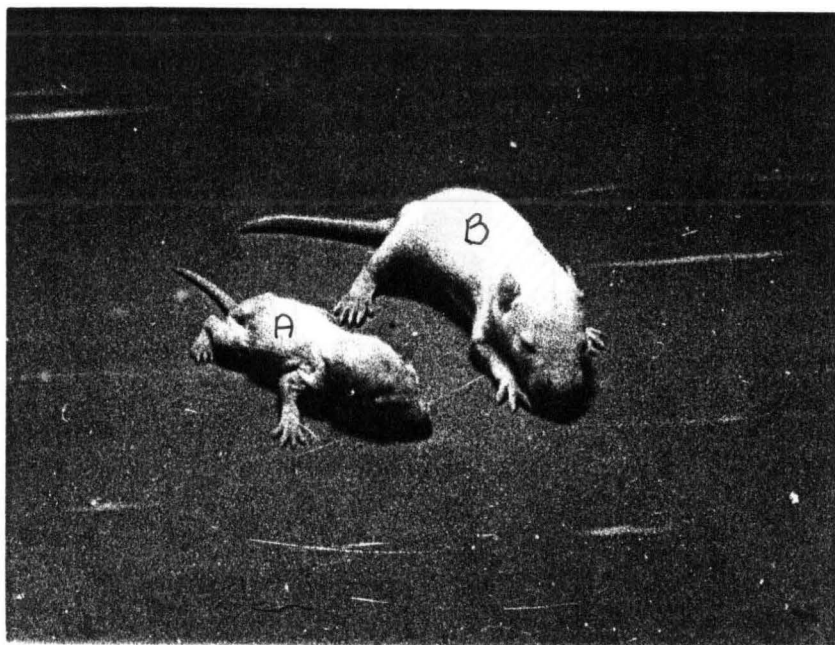
Az újszülött patkányokat (Wistar, LATI Gödöllő) négy csoportba osztottuk. A megszületésüket követő napon az első csoport állatait 0,5 mg hydrocortisonnal kezeltük. A második csoport liposomába zárt 1 mg RU 38486-ot kapott egy órával a hydrocortison kezelés előtt. A harmadik csoport csak RU 38486-t (1 mg), a negyedik pedig csak üres liposomát kapott. Mind az RU 38486-ot, mind a hydrocortisont subcutan adtuk az állatoknak.

Egyszeri 0,5 mg hydrocortison adására az újszülött patkányokon wasting szindróma típusos állapota alakult ki. A tünetegyüttesre jellemző volt: a rossz fizikai állapot, súlynövekedés elmaradása, vékony, ráncos bőr, elégtelen szőrnövekedés, hasmenés és állatok jelentős százalékanak elhullása.

Az RU 38486 előkezelés megakadályozta a wasting szindróma kialakulását (12. ábra). Mint az ábrán látható, a hydrocortison kezelés után, a 15. napon, a hydrocortisonnal kezelt állatokon a wasting szindróma tipikus képe alakult ki, míg az antiglucocorticoiddal előkezelt állatok nem különböztek a kontroll állatoktól.

Az RU 38486 a wasting szindróma letális hatását is felfüggesztette. Míg a hydrocortisonnal kezelt állatcsoportban a túlélés 48%-os volt, addig az RU 38486 előkezelésen átesett csoportban 89 %-os (13. ábra). Az üres liposomával kezelt kontroll és a liposomába zárt RU 38486-al kezelt állatok csoportjában elhullást nem észleltünk. A 15. napot túlélő állatok végleges túlélőknek voltak tekinthetők. A 14. ábra az állatok testsúlyának alakulását mutatja a különböző csoportokban. A hydrocortisonnal kezelt állatok testsúlya közel 30%-kal maradt

el a többi csoport állatainak testsúlyához viszonyítva. A túlélő állatoknál a wasting szindróma tünetegyüttese fokozatosan megszűnt, az állatok 3 hónapon belül utolérték fejlődésben társaikat. Az RU 38486 kezelés önmagában az állatok testsúlyának növekedését nem befolyásolta.



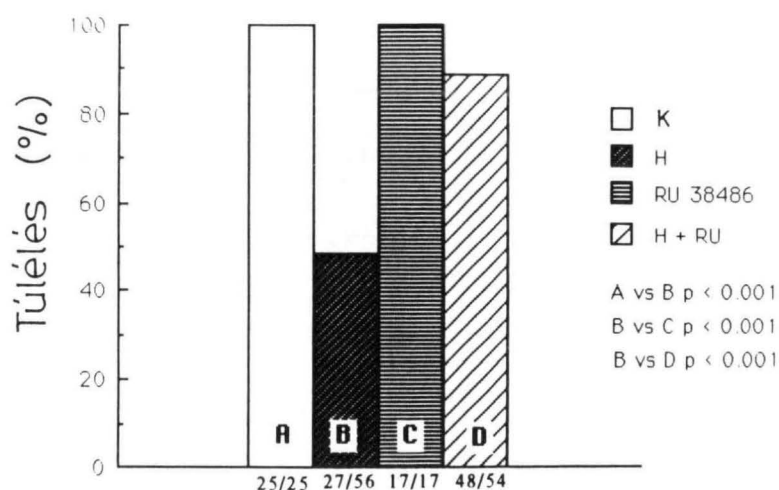
12. Ábra

Az RU 38486 hatása az újszülöttkori wasting szindrómára

A fényképen kettő 15 napos nőstény Wistar patkány látható.

A: hydrocortison (0.5 mg, sc) kezelt állat

B: hydrocortison és (0.5 mg, sc) és RU 38486 (1 mg, sc) kezelt állat.



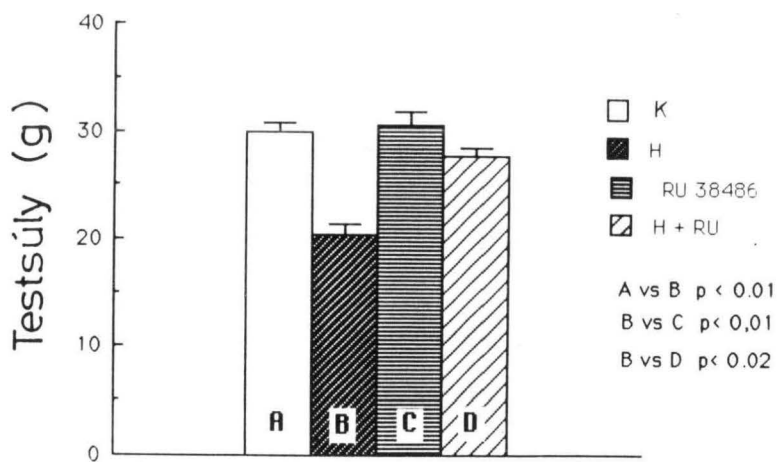
13. Ábra

Az RU 38486 hatása a wasting szindróma letális hatására

Az állatok túlélését 15 napos korukban rögzítettük. A tizenöt napot túlélő állatok végleges túlélőknek voltak tekinthetők. Az oszlopdiagrammon feltüntetett számok az él/összes állat számát jelzik az egyes csoportokban.

A: Kontroll csoport (K); B: Hydrocortisonnal kezelt csoport (H);

C: RU 38486-al kezelt csoport (RU); D: Hydrocortisonnal és RU 38486-al kezelt csoport (H + RU)



14. Ábra

Az RU 38486 hatása az állatok testsúlyára wasting szindrómában

Az ábra a túlélő állatok átlagos súlyát mutatja 15 napos korukban.

A: Kontroll csoport (K); B: Hydrocortisonnal kezelt csoport (H);
C: RU 38486-al kezelt csoport (RU); D: Hydrocortisonnal és RU 38486-al
kezelt csoport (H + RU)

5. GdCl_3 hatása a kísérletes septicus sokk lefolyására

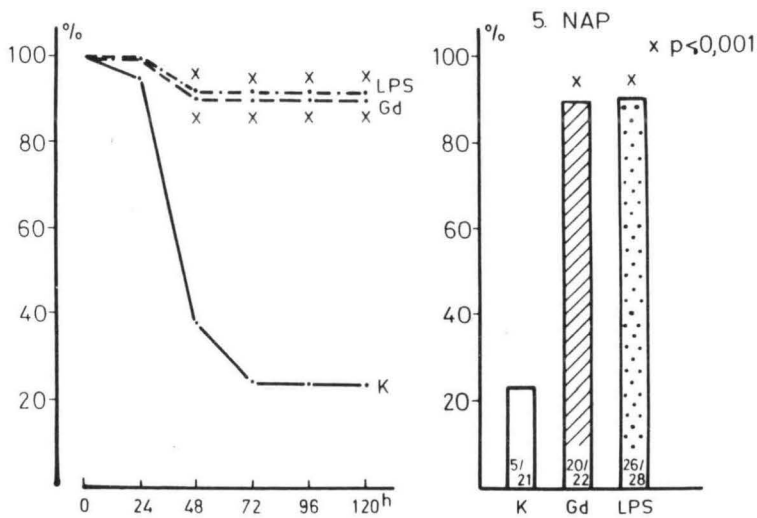
A caecum lekötésén és perforációján átesett patkányok (R Amsterdam) 77%-a, mint ahogyan az 15. ábra szemlélteti, a műtétet követő 5. napon belül elpusztult. Az állatok többsége 48 órán belül hullott el és megfigyelésünk szerint (több, mint egy hónap) az 5. napot túlélő állatok végleges túlélőknek voltak tekinthetők. Ha az állatok az akut peritonitis kiváltása előtt endotoxin vagy gadolinium klorid előkezelésben részesültek, rezisztenciájuk az akut peritonitis letális hatásával szemben jelentősen fokozódott. Az endotoxin, illetve a gadolinium klorid előkezelésben részesült állatok csoportjában a letalitás 8, illetve 10%-os volt, szemben az előkezelésben nem részesült állatok csoportjában észlelt 77%-os elhullással.

Vizsgálataink szerint, mint ahogyan a 16. ábra szemlélteti, ha a caecum lekötésével és perforációjával egyidejűleg az állatok splenectomian is átestek, a letalitás jelentősen fokozódott, mely különösen a műtétet követő 24 órán belül volt feltűnő. Az endotoxin előkezelés szignifikáns védelmet nyújtott a splenectomizált állatokban is. Az endotoxin előkezelésben részesült állatok csoportjában a túlélés 66%-os volt, szemben az előkezelésben nem részesült állatok csoportjában észlelt 16%-os túléléssel.

A splenectomizált állatokban a gadolinium klorid, mint ahogyan az II Táblázat szemlélteti, védőhatást nem fejtett ki.

A kísérleteinkben alkalmazott endotoxin előkezelés jelentősen emelte a phagocyt index értékét, valamint a máj és a lép súlyát (17. ábra).

A gadolinium klorid megváltoztatta a reticuloendothelialis rendszer szervfrakció értékeit: a májfrakció jelentős csökkenésével párhuzamosan, az extrahepatikus szervfrakciók (lép, tüdő) értéke jelentősen növekedett (18. ábra).



15. Ábra

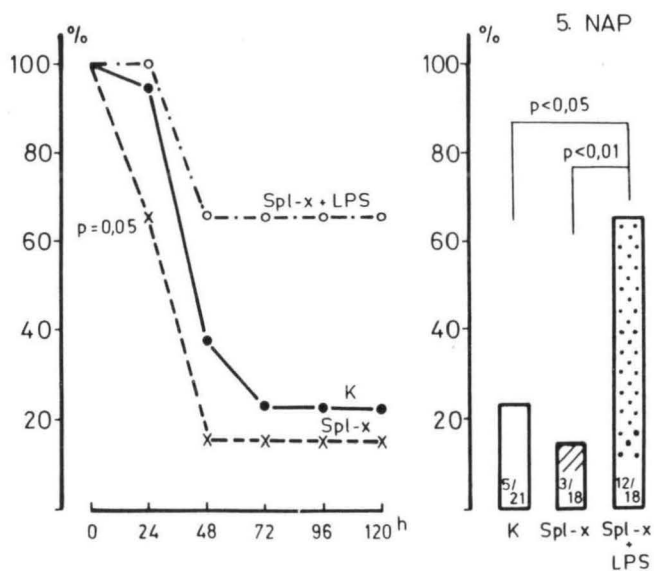
Endotoxin és gadolinium klorid hatása az állatok túlélésére akut peritonitisben

K: kontroll csoport

LPS: endotoxinnal előkezelt csoport (50 μg illetve 75 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, iv., a műtétet megelőző 6. és 4. napon)

Gd: gadolinium kloriddal előkezelt csoport (1mg/100g, iv., a műtétet megelőzően 24 órával)

Az oszlopdiagrammon feltüntetett számok az él/összes állat számát jelzik az egyes csoportokban.



16. Ábra

Splenectomia és endotoxin hatása az állatok túlélésére akut peritonitisben.

K: kontroll csoport

Spl-x: splenectomizált csoport

Spl-x + LPS: splenectomizált és endotoxinnal előkezelt csoport

A splenectomiát a műtéttel egyidejűleg végeztük.

Endotoxin előkezelés: lásd 15. ábrát

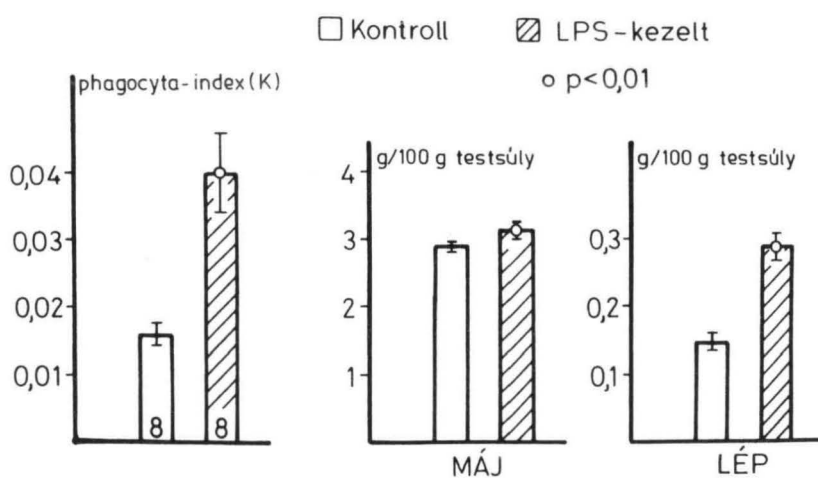
Az oszlopdiagrammon feltüntetett számok az él/összes állat számát jelzik az egyes csoportokban.

	Él/Össz.				
	24h	48h	72h	96h	120h
Kontroll	4/14	2/14	2/14	2/14	2/14
GdCl ₃	6/15	4/15	4/15	4/15	4/15
Szignifikancia	NS	NS	NS	NS	NS

II. Táblázat

A gadolinium klorid hatása splenectomizált állatok túlélésére akut peritonitisben.

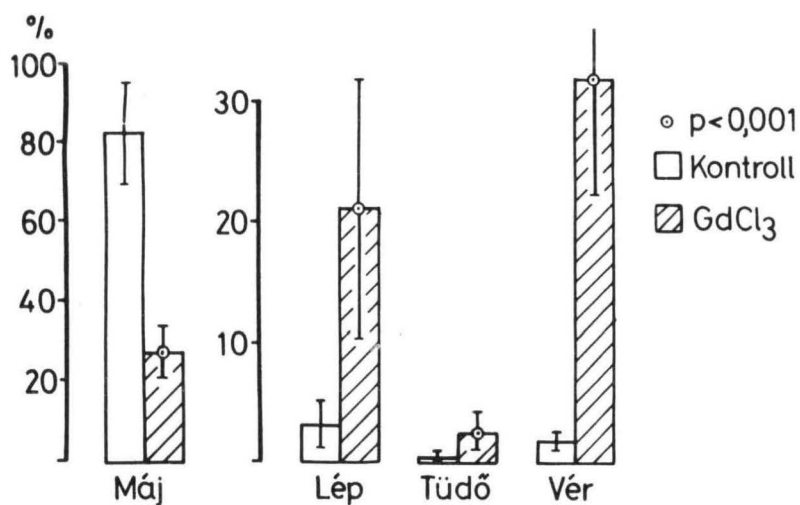
Mind a kontroll mind a GdCl₃-al előkezelt állatokon splenectomiát is végeztünk a caecum lekötésével és perforációjával egyidőben.
Gadolinium klorid előkezelés: lásd 15. ábra.



17. Ábra

Endotoxin hatása a phagocytosis index értékére, valamint a máj és a lép súlyára

Endotoxin előkezelés: 50 illetve 75 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ testsúly dózisban, iv., a RES vizsgálat előtti 6. és 4. napon. Az értékek tíz mérés átlagát mutatják.



18. Ábra

Gadolinium klorid hatása a Cr^{51} -el jelölt idegen vörösvértestek felvételére a májban, lépben és tüdőben.

Gadolinium kloridot (1mg/100g) intravénásan adtuk az állatoknak a reticuloendotheliális szervfrakciók meghatározása előtt 24 órával. Az értékek tíz mérés átlagát mutatják.

6. A GdCl_3 és a karragenin hatása az endotoxin eloszlására, az endotoxin érzékenységre és a TNF termelésre

A karragenin szignifikánsan fokozta a kísérleti állatok érzékenységét az endotoxin letális hatásával szemben (III táblázat). Míg a kontroll állatok csoportjában 60%, addig a kappa, lambda, iota karrageninnel előkezelt csoportokban 20, 5, 15%-os volt az állatok túlélése, az endotoxin beadása után 48 órával. A karragenin jelentősen megváltoztatta az endotoxin eloszlását a különböző szervekben (19. ábra). Az extrahepatikus (lép, tüdő, vér, csontvelő) szervfrakciók értékei a májfrakció csökkenésével párhuzamosan szignifikánsan emelkedtek.

A GdCl_3 a karrageninhez hasonlóan befolyásolta az endotoxin eloszlását a különböző szövetekben (20. ábra). Ezzel ellentétben a GdCl_3 nem változtatta meg a kísérleti állatok endotoxin érzékenységét (IV táblázat).

A 21., 22. és 23. ábra mutatja a karragenin és a GdCl_3 hatását az endotoxin indukálta TNF termelésre a szérumban, a májban, és a lépben. A karragenin szignifikánsan emelte a TNF szérum koncentrációját 1 és 2 órával az endotoxin beadását követően, valamint csökkentette a TNF koncentrációját a májban (1 órával az endotoxin beadása után) a kontroll és a GdCl_3 -al előkezelt csoportokkal összehasonlítva. A GdCl_3 nem változtatta meg a máj és a szérum TNF koncentrációját, de szignifikánsan növelte a TNF termelést a lépben.

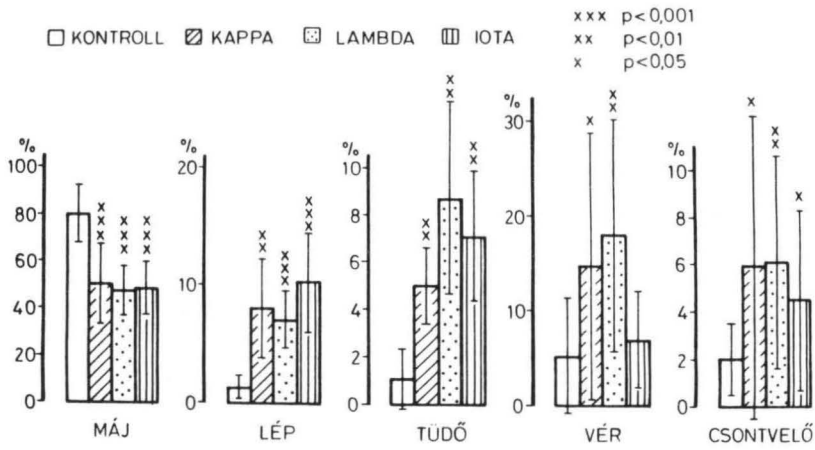
A GdCl_3 és a karragenin *in vitro* körülmények között sem a TNF termelését, sem toxicitását nem befolyásolta.

Kezelés	Él/Össz. (48h)	Túlélés (%)	Statisztika vs 1
1. LPS	30/50	60	
2. Kappa C + LPS	4/20	20	p<0.01
3. Lambda C + LPS	1/20	5	p<0.001
4. Iota C + LPS	3/20	15	p<0.01

III. Táblázat

A karragenin hatása az endotoxin érzékenységre

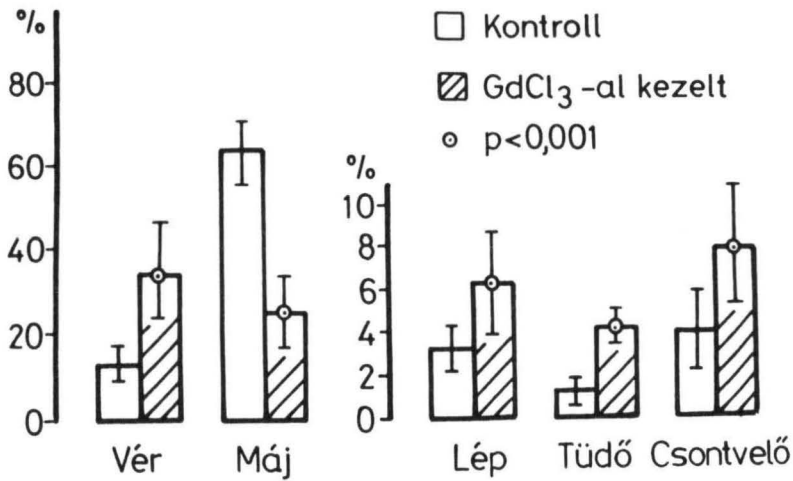
A him CFLP egerek különböző karragenin előkezelésben (5 mg/100 g, ip.) részesültek 24 órával az endotoxin (250 µg/100 g, ip.) beadását megelőzően. Az állatok túlélését 48 órával az endotoxin kezelést követően rögzítettük.



19. Ábra

A karragenin hatása a Cr^{51} -el jelölt endotoxin eloszlására

Az állatok különböző karragenint (5 mg/100 g, ip.) kaptak 24 órával az endotoxin (250 μg /100 g, ip.) beadását megelőzően. A szervek radioaktivitását az LPS kezelést követően 1 óra múlva határoztuk meg. Az értékek tíz mérés átlagát mutatják.



20. Ábra

A GdCl_3 hatása a Cr^{51} -el jelölt endotoxin eloszlására

Az állatok GdCl_3 -ot (1 mg/100 g, iv.) kaptak 24 órával az endotoxin (250 $\mu\text{g}/100$ g, ip.) beadását megelőzően. A RES frakció értékeit az LPS kezelést követően 1 óra múlva határoztuk meg. Az értékek tíz mérés átlagát mutatják.

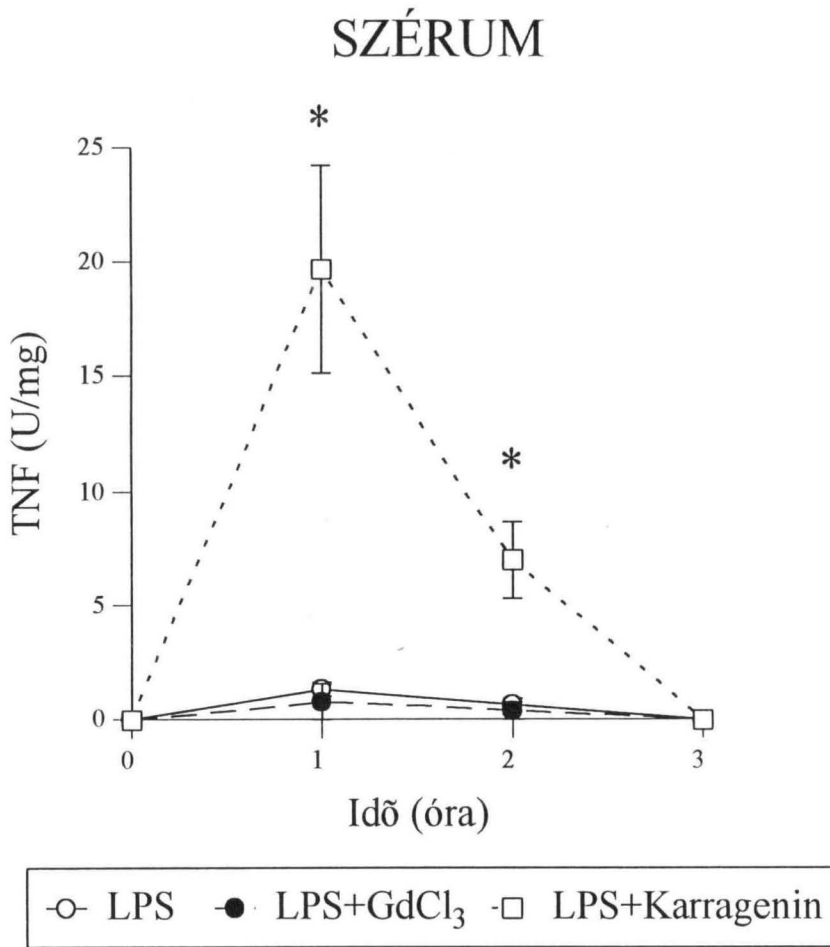
Kezelés	Él/Össz. (48h)	Túlélés (%)	Statisztika vs 1
1. LPS	12/20	60	NS
2. GdCl ₃	11/20	55	

IV. Táblázat

GdCl₃ hatása az endotoxin érzékenységre

A him CFLP egerek GdCl₃ előkezelésben részesültek 24 órával az endotoxin (250 ug/100 g, ip.) beadását megelőzően. Az állatok túlélését 48 órával az endotoxin kezelést követően rögzítettük.

NS: nem szignifikáns

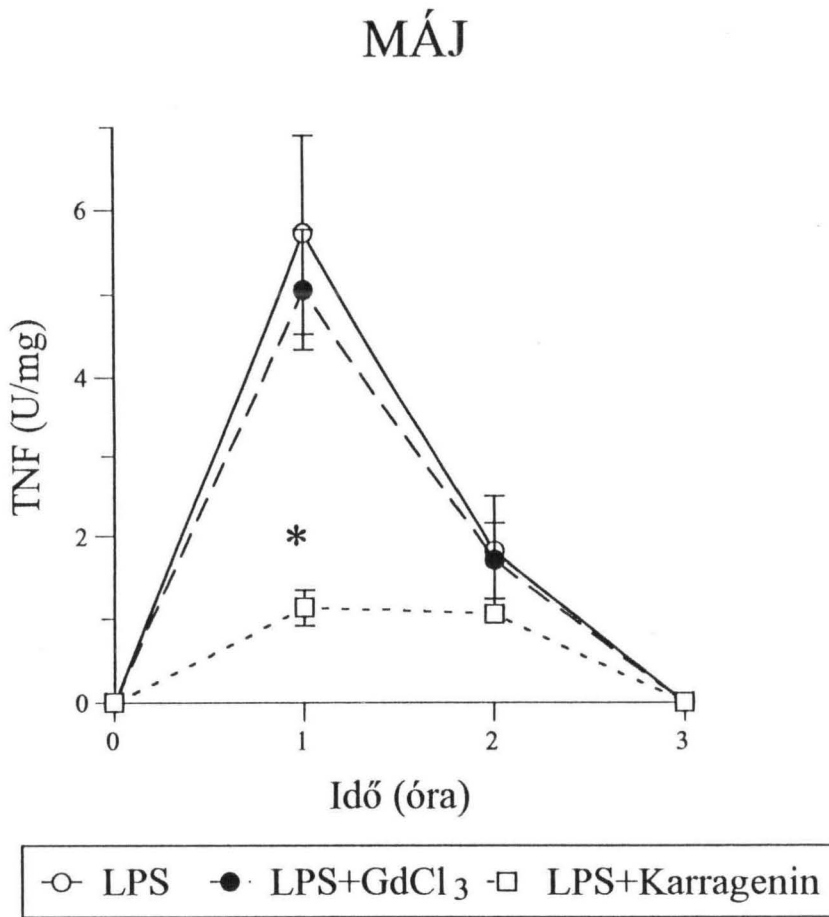


21. Ábra

A GdCl₃ és a karragenin hatása az endotoxin indukálta TNF produkcióra a szérumban

Az állatok GdCl₃-ot (1 mg/100 g, iv.) vagy karragenint (5 mg/100 g, ip.) kaptak 24 órával az endotoxin (1 µg/g, iv.) beadását megelőzően. A TNF aktivitását 1, 2, 3 és 4 órával az LPS beadását követően határoztuk meg. A középértékeket minden időpontban 10 mérés alapján számítottuk ki.

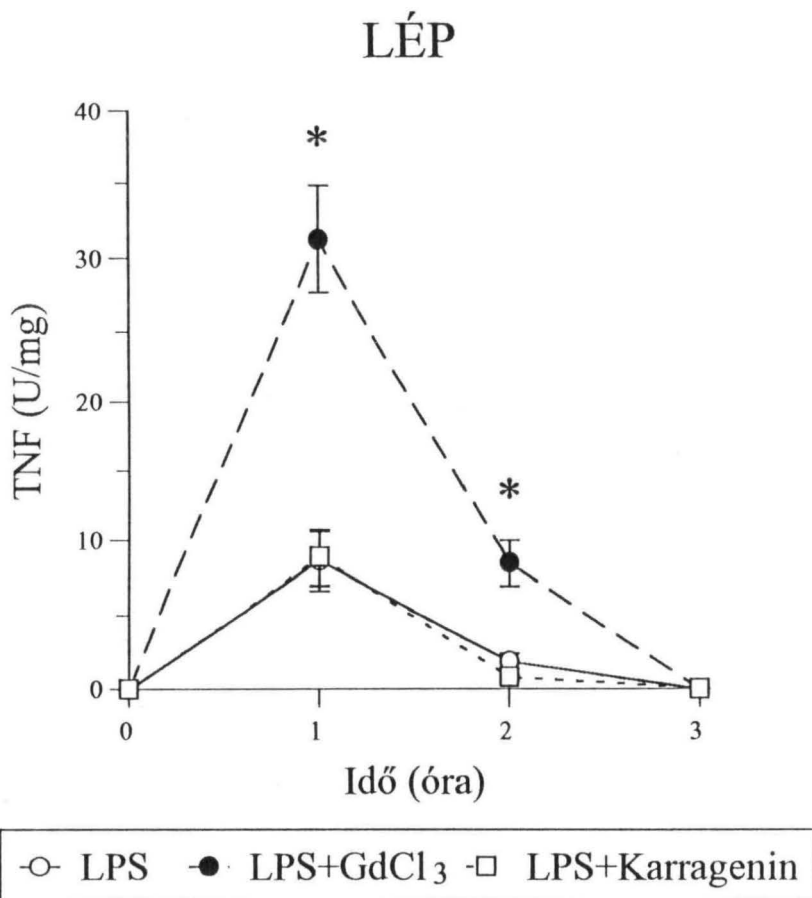
(*p < 0.05).



22. Ábra

A GdCl₃ és a karragenin hatása az endotoxin indukálta TNF produkcióra a májban

Magyarázat: lásd 21. ábrát



23. Ábra

A GdCl₃ és a karragenin hatása az endotoxin indukálta TNF produkcióra a lépben

Magyarázat: lásd 21. ábrát

MEGBESZÉLÉS

Már az 1940-es évek óta a szeptikus sokk jelentette az egyik legkomolyabb terápiás problémát a sebészeti és intenzív osztályokon. Napjainkban kezelésének elengedhetetlen elemei a következők: megfelelő antibiotikum terápia, a hypotensio kezelése (folyadék pótlás, vasopressorok), a megfelelő szervi perfúzió és oxigenizáció biztosítása, melyekhez szorosan hozzátartozik a cardio-pulmonális monitorizálás (Schwann-Ganz katéter, oxy-capno monitor stb.) is (Parker 1990). Ezen komplex terápia is csak kismértékben tudja csökkenteni a szeptikus sokk igen magas letalitását. Az elmúlt években számos új módszert, anyagot vizsgáltak főleg kísérletes és részben klinikai körülmények között (ld. alábbiakban, Bone, 1991):

Monoklonális ellenanyagok: endotoxin, exotoxin, TNF, IL 1, phospholipase A₂, complement C5a, adheziós molekulák, kontakt faktor ellen.

Receptor antagonisták: TNF, IL 1, thrombocyta aktiváló faktor, thromboxán A₂, bradikinin receptor ellen.

Un. oldható receptorok: TNF, IL 1

Gyulladás gátlók: Complement 1, 5 gátlók, Arachidonsav metabolizmus gátlói: ibuprofen, imidazol, diethylkarbamazin, leukotrien gátlók; fehérvérsejt gátlók: pentoxifillin, adenosin, antioxidánsok, nehézfém kelátok, oxigén szabadgyök scavangerek, proteáz inhibitorok.

Véralvadást befolyásoló anyagok: antithrombin III, protein C, thrombomodulin, hirudin, alpha antitrypsin Pittsburgh, plasminogén aktivátor, aprotinin, szójabab trypsin inhibitor.

Egyéb anyagok és módszerek: Antihisztaminok, naloxon, glukagon, surfactant, kalcium csatorna blokkolók, növekedési faktor és hormon, bél dekontamináció stb.

A szeptikus sokk kimenetelét egyértelműen javító kezelési eljárás a mai napig nem ismert.

Számos adat gyűlt össze arra vonatkozóan, hogy a szeptikus sokk patogenezisében kiemelt jelentősége van a bakteriális endotoxinoknak, a tumor nekrozis faktornak és az interleukin 1-nek. A szeptikus sokk terápiájában a figyelem elsősorban ezen anyagok közömbösítése vagy termelésük csökkentése felé irányult az utóbbi években. Endotoxin (Crowley és mtsai, 1990), TNF (Beutler és mtsai, 1985b; Tracey és mtsai, 1986) ellenes monoklonális ellenanyagok, TNF (van Zee és mtsai, 1992) és IL 1 (Fanslow és mtsai, 1990) oldható receptor, IL 1 receptor ellenes monoklonális (Gershenwald és mtsai, 1990) ellenanyag vagy antagonist (Ohlsson és mtsai, 1990; Alexander és mtsai, 1991) pozitív hatását a túlélésre állatkísérletek igazolták, de klinikai alkalmazásuk jelenleg még kérdéses.

Szeptikus sokkban az első prospektív, randomizált klinikai vizsgálatot humán, poliklonális, endotoxin ellenes (*E. coli* mutáns, un. J5 törzs ellenes) szérum alkalmazásával Ziegler és mtsai végezték (1982). Az antiszérum csökkentette a szeptikus sokk letalitását, különösen Gram-negatív fertőzések esetén. Ezeket az eredményeket később Baumgartner és mtsai (1985) is megerősítették. Az antiszérum alkalmazása, kedvező hatása ellenére, erősen korlátozott. Ennek oka egyrészt, hogy nehezen standartizálható és

reprodukálható, másrészt komoly veszélyt jelent az AIDS átadásának lehetősége. 1991-ben két új, IgM típusú endotoxin ellenes monoklonális ellenanyaggal (HA-1A; E5) végeztek klinikai vizsgálatokat (Ziegler és mtsai, 1991; Greenman és mtsai 1991). Az ellenanyagok javították a Gram-negatív szeptikus sokk lefolyását, de ez a későbbi klinikai alkalmazásuk során egyértelműen nem igazolódott. Ezért HA-1A endotoxin ellenes monoklonális ellenanyaggal újabb vizsgálatot végeztek (Dinorello és mtsai, 1993) és kimutatták, hogy az ellenanyag nem javítja, sőt a betegek egy csoportjában a szeptikus sokk letalitását növeli. Hasonlóképpen az IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) sem váltotta be a hozzáfűzött reményeket. A III. fázisú klinikai vizsgálatok eredményei (Fischer és mtsai, 1993) azt mutatták, hogy az IL-1Ra ugyan javítja a szeptikus sokk lefolyását, de ez a különbség a placeboval kezelt csoporttal összehasonlítva statisztikailag nem szignifikáns.

Mindezen adatok azt jelzik, hogy a szervezet természetes védekezőképessége nem elhanyagolható az endotoxin és a szeptikus sokkal szembeni védelemben. A glükokortikoid hormonoknak meghatározó szerepe van a szervezet rezisztenciájának megőrzésében. A különböző antibiotikumok mellett a szteroid hormonok voltak azok a gyógyszerek, melyeket a legkorábban használtak a szeptikus sokk kezelésében. A biztató kísérletes eredmények ellenére, napjainkban is vitatott a glükokortikoid hormonok szerepe a szeptikus sokk terápiájában. Az első tanulmány 1951-ben jelent meg szteroid hormonok alkalmazásáról (hydrocortison, fiziológiás dózisban) bacteriaemiával járó súlyos Streptococcus infekcióban (Hahn és mtsai, 1951), melyet azóta számos követett. Tudomásunk szerint, eddig 10 prospektív, randomizált klinikai vizsgálat történt a szteroid hormonok hatásosságának eldöntésére (Benett és mtsai, 1963; Rogers, 1970, Klastersky 1971, Thompson és mtsai, 1976; Schumer, 1976; Lucas

és Ledgerwood, 1984; Sprung és mtsai, 1984; Bone és mtsai, 1987; The Veterans Administration SSCSG, 1987; Luce és mtsai, 1988). A vizsgálatok közül csak Schumer (1976) igazolta a szteroid terápia szignifikáns pozitív hatását a túlélésre. A Gram-pozitív és Gram-negatív fertőzéseket szétválasztva négy tanulmány elemezte eredményeit (Benett és mtsai, 1963; Schumer, 1976; Bone és mtsai, 1987; The Veterans Administration SSCSG, 1987). Mind a négy vizsgálat szerint, csak Gram-negatív fertőzések esetén volt igazolható a szteroid kezelés eredményessége. A megfigyelést kísérletes vizsgálatok is alátámasztják, csak a tiszta Gram-negatív illetve endotoxin sokkban egyértelmű a szteroid hormonok védő hatása (Hinshaw, 1988). Ez magyarázhatja részben a szteroid kezelés eredménytelenségét is, mivel a klinikumban a szeptikus sokk általában kevert fertőzések eredményeként jön létre. Ezenkívül a glükokortikoidok alkalmazásának megkésettsége is szerepet játszhat hatásuk elégtelenségében. Kísérletes adatok igazolták, hogy az endotoxin sokk kiváltását követő első négy órában alkalmazott szteroid kezelésnek van csak protektív hatása (Sprung és mtsai, 1989). A másik nem elhanyagolható ok, hogy szeptikus sokkban glükokortikoid antagonistá hatások is érvényesülnek. Kísérleti állatban endotoxin hatására csökken mind a glükokortikoid receptorok száma, mind a glükokortikoidok affinitása a receptorhoz, valamint fokozódik a szteroid-receptor komplex disszociációja (McCallum és Stith, 1982; Stith és McCallum, 1983). Ennek egyik következménye, a máj glükoneogenezisének depressziójára létrejövő súlyos hypoglycaemia is. Az antagonistá mechanizmusokat az extrahepatikus szervekben, így a tüdőben, lépben, vesében, végtag izomzatában is igazolták (Stith és McCallum, 1986). Feltételezhető, hogy ezek a folyamatok hozzájárulhatnak a vesében a kóros glomeruláris filtrációhoz, vízvesztéshez, a cardiovascularis rendszerben a csökkent szívteljesítményhez és a súlyos vérnyomáseséshez, a végtagizmokban a fehérjeszintézis és katabolizmus

egyensúlyának felborulásához, valamint a RES sejtek cytokin produkciójának megváltozásához.

A prospektív randomizált klinikai vizsgálatok eredményei alapján az ^Antimicrobial Agents Committee of the Infectious Disases Society of America^ (1992) nem javasolja a nagy dózisú szteroid készítmények (prednison, prednisolon, dexamethason) adását Gram-negatív szeptikus sokkban. Az ajánlás viszont nem ellenzi az alacsony dózisú hydrocortison, úgynevezett ^replacement^ terápiát. Szeptikus sokkban általában emelkedett a kortizol szérumszintje, teljes mellékvese elégtelenség ritkán észlelhető (Schein és mtsai, 1990). A mellékvesék kortizol válasza azonban rendkívül lényegesnek látszik a túlélés szempontjából szeptikus sokkban, mivel klinikai megfigyelések szerint, azon betegeknél, ahol a szérumszint alacsony vagy a kortikotropinnal indukált szérumszint emelkedés elmarad a várttól, a betegség prognózisa nagyon rossz (Sibbald és mtsai, 1977; Finlay és mtsai, 1982; Rothwell és mtsai, 1991; Briegel és mtsai, 1991). Ennek a relatív mellékvese elégtelenségnek az oka, hogy szeptikus sokkban a mellékvesék kortikotropin érzékenysége jelentősen csökkent (Catalano és mtsai, 1984; Garcia és mtsai, 1990). Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a megfelelő glükokortikoid szérumszint biztosítására feltétlenül szükség van a szeptikus sokk kezelésében (Parillo és mtsai, 1990; Rothwell és mtsai, 1991; Briegel és mtsai, 1991).

Vizsgálataink szerint az antiglükokortikoid RU 38486, szignifikánsan fokozta a kísérleti állatok érzékenységét endotoxin és a kísérletes szeptikus sokk letális hatásával szemben. Ezen eredményeink megerősítik az endogén glükokortikoidok fontosságát a szeptikus és endotoxin sokkal szembeni védelemben. Kimutattuk azt is, hogy az RU 38486 képes fokozni egerekben az endotoxin indukálta TNF termelést a szérumban, májban és a lépben.

Hasonlóképpen kimutattuk, hogy az RU 38486 sejtenyészetben TNF szintézist indukál. Ezen eredmények jól magyarázzák az RU 38486 sokk szenzibilizáló hatását, másrészt igazolják az endogén glükokortikoidok szerepét a macrophagok TNF produkciójának és hatásának regulációjában. Tekintettel arra, hogy az RU 38486 receptor antagonista, feltételezhető, hogy a TNF produkcióra gyakorolt hatása is a szteroid receptoron keresztül jön létre. Ezt támasztja alá azon megfigyelésünk is, hogy a methylprednisolon teljesen felfüggeszti az RU 38486 hatását a TNF termelésre.

Az RU 38486 nemcsak a TNF termelést, hanem a hTNF toxikus hatását is jelentősen fokozta mind sejtenyészetben, mind kísérleti állatban. Ezen eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy az RU 38486 feltehetően fokozza az endogén TNF hatásait is. Új irodalmi adatok vannak arra vonatkozóan, hogy a TNF kísérleti állatban vetélést idéz elő (Parant és mtsai, 1990) és gamma interferonnal kombinálva toxikus az embrionális sejtekre (Suffys és mtsai, 1989). Mindezek felvetik, hogy az RU 38486 abortogén hatásában az antiprogesteron hatás mellett, a sejtek megnövekedett TNF érzékenysége is szerepet játszik.

A tumor nekrosis faktor és az interleukin 1 kulcsfontosságú patogenetikai faktorai a szeptikus és endotoxin sokknak. Ezen cytokinek közvetlenül hatva a hypothalamo-hypophysis rendszerre, kortikotropin és ACTH termelődést váltanak ki (Hermus és Sweep, 1990), melynek eredménye a mellékvesék glükokortikoid szekréciója. Az interleukin 1 nemcsak a kortikotropin felszabadítása révén, hanem közvetlenül is képes a mellékvesék glükokortikoid szintézisét fokozni (Roh és mtsai, 1987). Tekintettel arra, hogy a glükokortikoid hormonok fontos szabályozó szerepet játszanak az immunválaszban résztvevő sejtek működésében - melyet eredményeink is

alátámasztanak - teljessé válik az endokrin és az immunrendszer "feedback" jellegű kapcsolata. Ezt támasztja alá Zuckerman és munkatársainak a megfigyelése is (1989), hogy adrenalectomizált vagy hypophysectomizált kísérleti állatokban az endotoxin indukálta TNF szérumszintje magasabb és hosszabb ideig marad emelkedett a kontroll állatokéval összehasonlítva.

Az endotoxin tolerancia mechanizmusának jobb megismerése sok segítséget nyújthat a sepsis kezeléséhez. Kimutatták, hogy a kísérleti állatok endotoxin előkezelése jelentősen csökkenti érzékenységüket az endotoxin letális és metabolikus hatásaival szemben (Beeson, 1947; Balogh és mtsai, 1973; Agarwall és Lázár 1977). Bertók (1993) igazolta az endotoxin előkezelés (Tolerin^R, radio-detoxifikált endotoxin) jótékony hatását vastagbél műtött betegeken, a várható Gram-negatív fertőzés megelőzésében. Az endotoxin tolerancia genetikai mutációval is létrejöhét. Régóta ismert a C3H/HeJ egértörzs, mely közel 50-szer nagyobb endotoxin dózist képes tolerálni, mint a normál egerek (Sultzer, 1968; Lázár és Agarwal, 1986b).

A sepsis és endotoxin sok kulcsfontosságú mediátorainak is lényeges szerepe van az endotoxin tolerancia kialakulásában. TNF és IL1 előkezeléssel fokozható a kísérleti állatok rezisztenciája az endotoxin és sepsis letális hatásával szemben (Alexander és mtsai, 1991a, b). Kimutatták, hogy endotoxin tolerancia állapotában csökken a macrophagok endotoxin indukálta TNF (Fraker és Norton, 1988; Sanchez-Cantu és mtsai, 1989), IL6 (Leon és mtsai, 1992) produkciója, míg ezzel párhuzamosan az IL 1 termelésük jelentősen megnő (Zuckerman és mtsai, 1991). A C3H/HeJ egértörzs fokozott endotoxin toleranciája is részben a macrophagok mediátor produkciójának megváltozásával magyarázható. Ezekben az állatokban endotoxin hatására TNF termelés egyáltalán nem, vagy minimális mértékben mutatható ki (Beutler és

mtsai, 1986), viszont jelentősen megnő a macrophagok antigén prezentációja és IL1 produkciója (Baker és mtsai, 1991).

Vizsgálatainkban, az endotoxin előkezeléssel endotoxin toleránssá tett kísérleti állatok érzékenysége jelentősen csökkent nemcsak az endotoxin, hanem a kísérletes szeptikus sokk letális hatásával szemben is. Kimutattuk azt is, hogy az endotoxin tolerancia a reticuloendothelialis rendszer aktivitásának fokozódásával jár. Kísérleteink szerint, az endotoxin tolerancia fenntartásában az endogén glükokortikoidoknak is lényeges szerepük van, mivel az antiglükokortikoid RU 38486 felfüggeszti mind a mesterséges, mind a genetikusan endotoxin toleranciát. Az endogén glükokortikoidok fontosságát az endotoxin tolerancia fenntartásában más kutató csoportok is igazolták. Kimutatták, hogy endotoxin rezisztens egerekben jelentősen emelkedett a szérumban a kortizol szintje (Zuckerman és mtsai, 1989.) és adrenalectomisált állatokban endotoxin toleranciát nem lehet létrehozni (Evans és Zuckerman, 1991).

A glükokortikoidok számos érési, fejlődési folyamatban is elengedhetetlenül szükségesek. Indukáló szerepük fontos a tüdő surfactant phospholipid és protein alkotójának szintézisében is (Rooney 1985; Ballard, 1989; Liley és mtsai, 1989). Klinikai alkalmazásuk elfogadott koraszülötteknél a tüdő surfactant kialakulásának felgyorsítására illetve a hyalin membrán betegség megelőzésére. Gyerekkorban számos egyéb betegségben (asthma, nephrózis szindróma, rheumatoid arthritisz, stb.) alkalmaznak különböző szteroid készítményeket, melyeknek azonban néhány jól ismert mellékhatása van. Többek között ilyen a gyerekek szomatikus fejlődésének, növekedésének lelassulása (Hughes, 1987). Ismert az is, hogy újszülöttkorban adott kortizol patkányban és egérben, súlyos leromlással járó wasting szindrómát hoz létre (Schlesinger és Mark, 1964; Fachet és mtsai, 1969; Szilágyi és Lázár, 1978).

Vizsgálataink szerint az RU 38486 felfüggeszti a hydrocortison indukálta újszülöttkori wasting szindróma szomatikus és letális hatását. Ezen megfigyelésünk, úgy gondoljuk, a klinikum számára is jelentőséggel bírhat, az újszülött és gyermekkorban alkalmazott szteroid terápia nem kívánatos mellékhatásainak kivédésében.

A gadolinium (Gd) a ritkaföldfémek, vagy másnéven lantanidák csoportjába, a periodusos rendszerben a lantántól a luteciumig helyetfoglaló, a periódusos rendszer egyetlen helyére, a 6. periódus IIIB oszlopába sorolt, 57-71-es rendszámú elemeihez tartozik. A csoport tagjainak kémiai és fizikai tulajdonságai rendkívüli mértékben hasonlóak, mely a csoportba tartozó elemek hasonló külső elektronkonfigurációjával magyarázható.

A ritkaföldfémek előfordulása a természetben nem olyan ritka, mint ahogyan arra elnevezésük utal. Miután izolálásuk technikai nehézségei megoldódtak, kiderült, hogy elfordulásuk nem ritkább, mint számos más, jól ismert elemé, így például, az arzéné, vagy az antimoné. Bár a ritkaföldfémeket változó mennyiségben az ember különböző szerveiben is kimutatták (Erametsa és mtsai, 1968), fiziológiai funkciójukat nem ismerjük. Számos biológiai hatásuk folytán farmakológiai, kiterjedt ipari alkalmazásuk miatt pedig, toxikológiai jelentőségük van (Magnusson, 1963; Haley, 1965).

A ritkaföldfémek biológiai hatásai közül a legismertebbek a véralvadásra (Jancsó, 1961; Lázár és mtsai, 1969), a májra (Snyder és mtsai, 1959; Lázár és mtsai, 1970; Kádas és Jobst, 1973) kifejtett hatásuk, valamint kalcifikáló tulajdonságuk (Selye, 1962; Lázár és Selye, 1975). Igen nagy figyelem fordult a lantán illetve a lantanidák kalcium antagonistá hatása felé. Ezen elemek ugyanis biológiai rendszerekben, így sejtmembránokban is, hasonló ion-radiusuk és nagyobb vegyértékük következtében le tudják cserélni a kalcium

iont. A ritkaföldfémek több biológiai hatása is a membrán kalcium cseréjével, illetve a kalcium ionoknak a sejtmembránon keresztül történő mozgásának gátlásával hozható összefüggésbe (Best és mtsai, 1980; Kramsch és mtsai, 1980).

Munkacsoportunk korábbi vizsgálataiban a ritkaföldfémek egy eddig nem ismert, új biológiai hatását figyele meg. Biozzi és mtsai (1953) tus-clearance módszerével végzett vizsgálatok szerint különböző organikus ritkaföldfém vegyületek, mint az addig alvadás- és gyulladásgátló (Jancsó, 1961, Oyvin és mtsai, 1964) hatásáról ismert neodinium pirokatechin diszulfonát (Phlogodym^R, Kőbányai Gyógyszerárugyár, Budapest) és a -ketovaleriansav didimium sója (Helodym 88^R, Helopharm K.G., Németország), valamint az anorganikus ritkaföldfém vegyületek, így a ritkaföldfémek csoportjába tartozó számos elem egyszerű sója (kloridja) jelentős reticuloendothelialis blokkírozó hatással rendelkeznek. Intravénás injekciójuk után 24 órán belül mind patkányban, mind pedig egerben jelentős reticuloendothelialis blokádnak fejlődik ki, mely a ritkaföldfém dózisától függően napok múlva is fennáll (Lázár, 1973; Husztik és mtsai, 1980). A ritkaföldfémek RES-deprimáló hatásukat nem akkor fejtik ki, amikor vérbeli koncentrációjuk magas, a hatás kifejlődésére latencia időre van szükség. Magnusson (1963) izotóp ritkaföldfémekkel végzett vizsgálatai szerint, az intravénásan bevitt ritkaföldfémek koncentrációja a vérben gyorsan esik, a beadása után 1 óra múlva a vérben a bevitt mennyiségnek csak 1-10%-a mutatható ki, 24-48 óra múlva pedig, amikor vizsgálataink szerint kifejezett RES-hatás észlelhető, koncentrációjuk leesik a bevitt dózis 0.01 %-alá.

A reticuloendothelialis rendszer funkcionális állapotának vizsgálatára kidolgozott eljárások feltárták, hogy a RES funkcionális aktivitásának felfüggesztése, ^blokkírozása^ nem könnyű feladat. A korábbi feltételezés szerint a RES sejtek ^szaturálásával^ ható kolloidális anyagok viszonylag nagy

dózisai is csak átmeneti, rövid ideig tartó blokádot (Stiffel, 1959), illetve a reticuloendothelialis rendszer proliferációs válasza, kompenzatórikus hyperplasiája miatt a kívánt hypofunkció helyett, sok esetben inkább hyperfunkciót okoznak (Blickens és Di Luzio, 1964). A gadolinium klorid nem csak a normál, nem aktivált, hanem a különböző reticuloendothelialis stimulálókkal, így zymozannal, trioleinnel, BCG-vel, oestradiollal, aktivált macrophagok funkcióját is gátolja (Lázár, 1973; Husztik és mtsai, 1977). Szemben a korábban használt RES blokkoló módszerekkel, a $GdCl_3$, az alkalmazott dózisban, káros mellékhatást nem fejt ki, a blokádnak napokig fennáll és a RES depressziós fázist nem követi hyperphagocytosis (Peschle és mtsai, 1976). A $GdCl_3$ -al kiváltott reticuloendothelialis blokádnak a Kupffer-sejtek működésének gátlására vezethető vissza (Husztik és mtsai, 1980). Mindezen tulajdonságai alapján alkalmas módszer a Kupffer-sejtek immunválaszban betöltött szerepének vizsgálatára (Person és mtsai, 1986; Gogenheim és mtsai, 1988; Calery és mtsai, 1989; Kamei és mtsai, 1990).

A máj Kupffer-sejtjei révén a szervezet legnagyobb funkcionális kapacitással rendelkező reticuloendothelialis szerve (Crofton és mtsai, 1978). A Kupffer-sejtek lényeges szerepet töltenek be a specifikus immunitásban. Az újabb kutatások kimutatták, hogy képesek ún. MHC kettes osztályú (Class II, Ia) antigének expressziójára (Lautenschlager, 1984), az antigén felismerésére és prezentációjára (Rogoff és Lipsky, 1980; Richman és mtsai, 1979), valamint IL 1 (McCuskey és mtsai, 1987), TNF (Decker és mtsai, 1989) prosztaglandin E2 (Decker, 1985) termelésére.

A $GdCl_3$ -dal kiváltott Kupffer-sejt phagocytosis blokádnak segítségével immunmoduláló effektus érhető el: jelentősen fokozza a birkavörösvértetekkel kiváltott humorális immunválaszt (Lázár és mtsai, 1985a) és kivédi az egerek anaphylaxias sokkját (Lázár és mtsai, 1985b), mely a máj szerotonin és

hisztamin koncentrációjának jelentős csökkenésére vezethető vissza (Lázár és mtsai, 1991). Jelen kísérleteinkben kimutattuk, hogy a GdCl_3 fokozza a kísérleti állatok rezisztenciáját a caecum lekötésével és perforációjával kiváltott szeptikus sokk letalitásával szemben és jelentősen fokozza az endotoxin indukálta TNF termelést a lépben. Szeptikus sokkban komoly pathogenetikai jelentőséget tulajdonítanak a máj Kupffer sejtek mediátor túlprodukciónak (Border, 1988; Schoeffel és mtsai, 1989). A GdCl_3 kedvező hatása szeptikus sokkban, így elsősorban a Kupffer-sejtek működésének megszüntetésére vezethető vissza. A GdCl_3 továbbá jelentősen megváltoztatja a reticuloendothelialis rendszer szervfrakció értékeit: a máj frakció jelentős csökkenésével párhuzamosan az extrahepatikus szervfrakciók (lép, tüdő, csontvelő) jelentősen növekednek. A GdCl_3 hatásának magyarázatában továbbá kézenfekvőnek látszik, hogy a Kupffer-sejt phagocytosis blokádját hatására előtérbe kerül az immunvédekezésben fontos szerepet játszó lép működése. Ezen elképzelésünket alátámasztja azon megfigyelésünk is, hogy splenectomizált állatokban a GdCl_3 a szeptikus sokk letális hatásával szemben védőhatást nem fejtett ki.

A RES aktivitás és az endotoxin érzékenység kapcsolata rendkívül komplex és ellentmondásos. Ismert, hogy kísérleti állatban az endotoxin beadását követően RES depresszió jelentkezik, mely egészen az állatok haláláig fennáll (Altura és Hersey, 1973). A túlélők esetén azonban, a RES funkció fokozatos normalizálódását követően hyperphagocytosis alakul ki. Hasonló a RES funkcionális változása más sokk állapotokban is, mint pl. haemorrhagiás sokkban (Altura, 1974). Jelen vizsgálataink szerint, az endotoxin előkezeléssel endotoxin toleránssá tett állatokban a RES aktivitás fokozódása figyelhető meg, mely részben magyarázza az állatok megnövekedett rezisztenciáját endotoxinnal

szemben. Eredményeink megerősítik a máj szerepének fontosságát az endotoxin intravascularis clearanceben. Ez különösen endotoxin toleranciában tűnik lényegesnek, mikor a keringő endotoxinoknak a gyors kiszűrése elsősorban a májon keresztül történik (Utili és mtsai, 1977). A máj endotoxin eltávolító kapacitása viszont nem meghatározója az endotoxin érzékenységeknek. Míg a karragenin és a $GdCl_3$ hasonlóképpen változtatja meg a RES frakció és az endotoxin eloszlás értékeit - a májfrakció jelentős csökkentésével párhuzamosan jelentősen megnő az extrahepatikus (szérum, lép, csontvelő) szervfrakciók értéke - addig az endotoxin érzékenységre kifejtett hatásaik eltérőek. Vizsgálataink szerint a $GdCl_3$ nem befolyásolja az endotoxin érzékenységet, azonban fokozza a septicus sokkal szembeni rezisztenciát. Ezzel ellentétben a RES-deprimáló karragenin egyes RES stimuláló anyaghoz hasonlóan, mint a BCG, zymosan, *Corynebacterium parvum*, glukán, jelentősen fokozza az endotoxin toxikus és letális hatását is (Green és mtsai, 1977; Peavy és mtsai, 1979; Di Luzio és mtsai, 1980). A RES aktivitás és az endotoxin érzékenység ellentmondásosságát jól jelzi a polyanethol szulfonát és a methyl palmitát különböző hatásai is. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai szerint a polyanethol szulfát jelentősen csökkenti a RES aktivitását és fokozza az endotoxin érzékenységet (Lázár és mtsai, 1984), ezzel ellentétben a methyl palmitát, mely jól ismert RES depresszáns, szignifikánsan fokozza a kísérleti állatok rezisztenciáját az endotoxin letális hatásával szemben (Di Luzio és Crafton, 1969).

Szoros összefüggés mutatható ki a TNF szérum szintje és a kísérleti állatok endotoxin érzékenysége között. A $GdCl_3$ nem befolyásolja a keringő TNF szintjét és az endotoxin érzékenységet, a karragenin azonban jelentősen fokozza mind a szérum TNF szintjét, mind pedig a kísérleti állatok endotoxin

érzékenységét. A karragenin mellett, hogy szelektív módon felfüggeszti a Kupffer-sejtek működését, prosztaglandin (Siegel és mtsai, 1981; Splawinski és mtsai, 1978) és szabadgyök termelődést (Oyangui, 1976) vált ki, melyek közvetlenül vagy áttételesen TNF szintézist képesek indukálni (Schade és mtsai, 1989; Chaudhri és Clark, 1989). A macrophagokon kívül az immunrendszer egyéb sejtjei, így a T és B lymphocyták (Sung és mtasi, 1988a,b), polymorphonuclearis leukocyták (Yamazaki és mtasi, 1989), és az ún. "natural killer" sejtek (Degliantoni és mtasi, 1985) is képesek TNF termelésére. Így a karragenin hatásának magyarázatában feltételezhető, hogy a prosztaglandin és az oxigén szabadgyök felszabadulás révén fokozódik az extrahepatikus macrophag és nem macrophag jellegű immunsejtek TNF termelése.

ÖSSZEFOGLALÁS, FŐ KÖVETKEZTETÉSEK

1. Vizsgálatainkban újabb adatokat szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy az endogén glükokortikoid hormonok lényeges szerepet töltenek be az endotoxin és a szeptikus sokkal szembeni rezisztencia, valamint az endotoxin tolerancia fenntartásában. Ezen eredményeink úgy gondoljuk, segítséget nyújthatnak a sokat vitatott szteroid terápia alkalmazásához szeptikus sokkban.

Egerekben végzett kísérleteinkben kimutattuk, hogy az RU 38486, jelentősen fokozza a bakteriális endotoxin toxicitását, valamint az emberi kórképhez igen közel álló - a caecum lekötésével és perforációjával kiváltott - akut peritonitis, illetve a hozzá társuló szeptikus sokk letalitását.

Vizsgálataink szerint az RU 38486 megszünteti az endotoxin előkezeléssel kiváltott endotoxin toleranciát, és felfüggeszti az endotoxin védőhatását a szeptikus peritonitis, illetve a szeptikus sokk letalitásával szemben.

2. Kísérleteink arra utalnak, hogy a glükokortikoid-dependens folyamatok fontos szerepet játszanak a TNF termelésében és hatásának regulációjában. Kimutattuk, hogy az antiglükokortikoid, RU 38486, mind *in vivo*, állatkísérletekben, mind pedig *in vitro*, szövettenyészetben, jelentősen növeli a TNF termelését és toxicitását.

Kísérleti állatban az RU 38486 fokozta az endotoxinnal kiváltott TNF termelést. Az endotoxinnal kezelt állatokéhoz viszonyítva az endotoxinnal és RU 38486-al kezelt állatok szérumában, máj-, lép-kivonatában jelentősen

megnőtt a TNF koncentrációja, és az antiglükokortikoid hatása antagónizálható volt egyidejű methylprednisolon kezeléssel.

In vitro vizsgálatainkban a genetikai transzformáción átesett, hTNF termelésre képes M9 sejtek TNF produkciója közel háromszorosára emelkedett az antiglükokortikoid hatására. Továbbá kimutattuk azt is, hogy az RU 38486 TNF szintézist képes indukálni a P388 myeloid tumorsejtekben.

Kísérleteink szerint az RU 38486 a TNF termelést is jelentősen fokozta mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között. Egér kísérleteinkben az RU 38486 szignifikánsan növelte a TNF toxikus és letális hatását LPS-sel kombinálva valamint LPS adása nélkül is. *In vitro* sejttenyészetben az L929 sejtek TNF érzékenysége antiglükokortikoid jelenlétében jelentősen fokozódott, és a TNF-fel szemben rendkívül rezisztens 3T3 egér fibroblast sejtek RU 38486 hatására TNF rezisztenciájukat részben elvesztették.

3. Vizsgálataink szerint az RU 38486 felfüggeszti a hydrocortison indukálta wasting szindróma szomatikus és letális hatását. Ezen megfigyelésünk a klinikum számára is jelentőséggel bír a koraszülöttek szteroid kezelésénél a nem kívánatos mellékhatások kivédésében.

4. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a Kupffer sejtek működésének felfüggesztésével immunmoduláló effektus érhető el.

Vizsgálatainkban GdCl_3 -dal vagy karrageninnel kiváltott Kupffer-sejt phagocytosis blokád jelentősen megváltoztatta a RES-frakció és az endotoxin eloszlás értékeit, a májfrakció csökkenésével párhuzamosan megnőttek az extrahepatikus (szérum, lép, csontvelő) szervfrakciók értékei. A GdCl_3 fokozta a kísérleti állatok rezisztenciáját az akut szeptikus peritonitis és szeptikus sokk letálisával szemben, azonban az endotoxin érzékenységüket nem változtatta meg. Továbbá kimutattuk, hogy a GdCl_3 fokozza az endotoxin indukálta TNF termelést a lépben. A GdCl_3 -al kiváltott Kupffer-sejt phagocytosis blokád perspektivikusan alkalmas módszernek látszik kedvező terápiás effektusok elérésére szeptikus sokkban.

Vizsgálatainkban a karragenin jelentősen fokozta a kísérleti egerek endotoxin érzékenységét és ezzel párhuzamosan növelte a keringő TNF szintjét. A karragenin a GdCl_3 -hoz hasonlóan *in vitro* körülmények között nem befolyásolta a TNF termelését és toxicitását.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan mondok köszönetet édesapámnak, Lázár Györgynek, aki megismertetett a kórélettani, élettani kutatásokkal, aki biztosította a kutatásokhoz szükséges feltételeket, hasznos tanácsaival és szigorú kritikájával segített a kísérletek megtervezésében és a közlemények megírásában, és utoljára, de nem utolsó sorban, aki mellett megszerettem a kísérletes orvostudományt.

Köszönettel tartozok továbbá kollégáimnak, akik segítettek abban, hogy a klinikai munka mellett kísérleteimet végezhessem.

Kísérletek végrehajtásában Varga Istvánné laboratóriumi asszisztensnek mondok köszönetet.

Külön köszönöm Boda Krisztina matematikus áldozatos munkáját az eredmények statisztikai kiértékelésében.

Végezetül feleségemnek köszönöm meg, hogy biztosította a munkámhoz szükséges nyugodt feltételeket, valamint tanácsait, kritikáját a disszertáció megírásában.

IRODALOM:

1. **Agarwal MK:** An integrative analysis of endotoxic reactions. *Die Naturwissenschaften* 62:167-171; 1975.
2. **Agarwal MK, Hainque Moustard N, Lázár G:** Glucocorticoid antagonist. *FEBS Lett.* 217:221-226; 1987.
3. **Agarwall MK, Lázár G:** Metabolic basis of endotoxycosis. *Microbios.* 20:183-214; 1977.
4. **Agarwal MK, Lázár G:** Modulations of endotoxycosis by steroids and diabetogenic agents in responder and refractory mice strains, in: *Immunopharmacology of endotoxycosis* (Agarwal MK and Yoshida M eds) Berlin, de Gruyter, old. 299-314, 1984.
5. **Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE:** Human tumor necrosis factor production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 260:2345-2354; 1985.
6. **Alexander HR, Doherty GM, Block MI, Kragel PJ, Jensen JC, Langstein HN, Walker E, Norton JA:** Single-dose tumor necrosis factor protection against endotoxin induced shock and tissue injury in rats. *Infect. Immunity.* 59:3889-3894; 1991a.

7. Alexander HR, Doherty GM, Fraker DL, Block MI, Swendenborg JE, Norton JA: Human recombinant interleukin -1 alpha protection against the lethality of endotoxin and experimental sepsis in mice. *J. Surg. Res.* 50(5):421-424; 1991b.

8. Alexander HR, Doherty GM, Buresh CM, Venzon DJ, Norton JA: A recombinant human receptor antagonist to interleukin-1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *J. Exp. Med.* 173: 1029-1032; 1991c

9. Allison AC Harington JS, Birbeck M: An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages *J. Exp. Med.* 124:141-153, 1966.

10. Altura BM: Hemorrhagic shock and reticuloendothelial system phagocytic function in pathogen-free animals. *Circ. Shock* Vol1, No4:295-300; 1974.

11. Altura BM, Hersey SG: Reticuloendothelial function in experimental injury and tolerance to shock. *Adv. Exp. Med. Biol.* 33:545-569; 1973.

12. American College of Chest Physicians/Society of Critical Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Medicine Consensus Conference Committee. *Critical Care Medicine* 20:864-874, 1992.

13. Antimicrobial Agents Committee of the Infectious Diseases Society of America: Guidelines for use of systemic glucocorticoids in the management of selected infections. *J. Infect. Dis.* 165:1-13; 1992.

14. Aschoff L: Das reticulo-endotheliale system. *Ergebn. inn. Med. Kindeheilk.* 26: 1-118; 1924.

15. Baker C, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE: Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 94:331-335; 1983.

16. Baker C, Niven-Fairchild AT, Yamada A, Caragnano CL, Kupper TS: Macrophage antigen presentation and Interleukin 1 production after cecal ligation and puncture in C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Arch. Surg.* 126:253-258; 1991.

17. Ballard PL: Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocr. Rev.* 10:165-181; 1989.

18. Balogh A, Bertók L, Kocsár L: Kísérletes acut peritonitisz szeptikus shock kivédése detoxifikált endotoxin előkezeléssel. *Kísérletes Orvostudomány* 25:157-160; 1973.

19. Baumgartner JD, Glauser MP, McCutchan JA, Melle G van, Voigt M, Luethy R, Ziegler EJ, Klauber MR, Muehlen E, Chiolero R, Geroulanos S: Prevention of Gram negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid. *Lancet.* ii: 59-63; 1985.

20. Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM: Interleukin-1 induces prolonged L-arginin-dependet cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 87: 602-608; 1991.

21. **Becker RM:** Suppression of local tissue reactivity (Shwartzman phenomenon) by nitrogen mustard, benzol and x - ray irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 69: 247-250; 1948.
22. **Beeson PB:** Tolerance to bacterial pyrogenes, Factors influencing its development. *J. Exp. Med.* 86:29-34; 1947.
23. **Bennett IL, Finland M, Hamburger M, Kass EH, Lepper M, Waisbren BA:** The effectiveness of hydrocortisone in the management of severe infections. *JAMA* 183:462-465; 1963.
24. **Bennett GD. Kay MMB:** Momeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp. Hematol.* 9: 297-307; 1981.
25. **Bertini RM, Bianchi, Ghezzi P:** Adrenectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 167:1708-1712; 1988.
26. **Bertók L:** Lead acetate-induced endotoxin-hypersensitivity. *Experientia* 41:575-576; 1985.
27. **Bertók L:** Shock preventing effect of radiodetoxified endotoxin preparation (Tolerin). *Circ. Shock. Suppl.* 2:58-59.; 1993.

28. **Best LC, Bone EA, Jones PBB, Russell RGG:** Lanthanum stimulates the accumulation of cyclic AMP and inhibits secretion and Thromboxane B₂ formation in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta.* 632:336-342; 1980.

29. **Beutler B:** Cytokines in shock. in: *Mediators of Sepsis* (Lamy M, Thijs LG eds.) Springer Verlag, 1992, 51-68, 1992

30. **Beutler B, Cerami A:** Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.* 316:379-385; 1987.

31. **Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YCE, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A:** Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316:552-554; 1985a.

32. **Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A:** Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232:977-980; 1986.

33. **Beutler B, Milsark IW, Cerami AC:** Passive immunization againsts cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science.* 229:869-871; 1985b.

34. **Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A:** Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.* 161:984-95; 1985c.

35. **Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone Jr. MA:** Interleukin (IL1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 160: 618-623; 1984.

36. **Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA:** Interleukin-1 acts in cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocytes cell lines. *J. Clin Invest.* 76:2003-2011; 1985.

37. **Bilbey DLJ, Nicol T:** Effect of various natural steroids on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system. *Nature (London).* 182:674; 1958.

38. **Billiau A, Vandekerchove F:** Cytokines and their interactions with other inflammatory mediators in the pathogenesis of sepsis and septic shock. *Eur. J. Clin Invest.* 21:559-573; 1991.

39. **Biozzi G, Benacerraf F, Halpern BN:** Quantitative study of the granulopenic activity of the reticuloendothelial system. II. A study of the kinetics of the granulopenic activity of the R.E.S. in relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity. *Brit. J. Exp. Pathol.* 34:441-457; 1953.

40. **Blickens DA, Di Luzio NR:** The effect of methylcellulose on the reticuloendothelial system. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1:68-76, 1964.

41. **Bonavida B, Paubert-Braquet M, Hosford D, Braquet P:** The involvement of platelet-activating factor (PAF)-induced monocyte activation and tumor necrosis factor (TNF) production in shock. *Prog. Clin. Res.* 308:485-489, 1989.

42. **Bone RC:** A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. *JAMA.* 266:1686-1691; 1991.

43. **Bone RC, Fischer CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA:** A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 317:653-658; 1987.

44. **Border JR:** Hypothesis: Sepsis, multiple organ failure, and the macrophage. *Arch. Surg.* 123:285-286; 1988.

45. **Brade H, Brade L, Schade U, Zahringer U, Hoist O, Rozalski A, Rohrschadt E, Reitschel E:** Structure, endotoxicity, immunogenicity of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins, O-antigens) in *Bacterial Endotoxins: Pathophysiological Effects, Clinical Significance and Pharmacological Control* (Brade H, Wethphal eds) Alan R. Liss. New York, Chap. 17, 1977.

46. **Brade V, Hall RE, Colten HR:** Biosynthesis of pro-C3, a precursor of the complement. *J. Exp. Med.* 146: 759-765; 1977.

47. **Bradfield JWB, Souhami RL, Addison IE:** The mechanism of the adjuvant effect of dextran sulphate. *Immunology.* 26: 383-392; 1976.

- 48. Braude AI, Carez FJ, Sutherland D, Yalesky M:** Studies with radioactive endotoxin. I. The use of Cr⁵¹ to label endotoxin of *Escherichia coli*. J. Clin. Invest. 34:850-857; 1955.
- 49. Briegel J, Forst H, Hellinger H, Haller M:** Contribution of cortisol deficiency to septic shock. Lancet 338:507-508; 1991.
- 50. Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Fiers W:** Selective species specificity of tumor necrosis factor for toxicity in the mouse. Lymph. Cyt. Res. 11:193-196; 1992.
- 51. Calandra T, Baumgartner JD, Grau GE, Wu MM, Lambert PH, Schellekens J, Verhoef J, Glauser MP, and the Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group:** Prognostic values of tumor necrosis factor, interleukin-1, interferon alpha, and interferon gamma in the serum of patients with septic shock. J. Infect Dis. 161:982-987; 1990.
- 52. Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, Verhoef J, the Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group:** Treatment of Gram-negative septic shock with human IgG antibody to *Escherichia coli* J5: a prospective, double blind, randomized study. J. Infect. Dis. 158:312-319; 1988.
- 53. Calery MP, Kamei T, Flye MW:** Kupffer cell blockade inhibits induction of tolerance by the portal venous route. Transplantation 47:1092-1093; 1989.

54. **Cantrell E, Bresnick E:** Benzpyrene hydroxylase activity in isolated parenchymal and nonparenchymal cells of rat liver. *J. Cell. Biol.* 52: 316-321; 1972.

55. **Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B:** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72:3666-3670; 1975.

56. **Catalano RD, Parameswaran V, Ramchandram J, Trunkey DD:** Mechanisms of adrenocortical depression during *Escherichia coli* shock. *Arch. Surg.* 119:145-150; 1984.

57. **Catanyaro PJ, Schwarty HJ, Graham RC:** Spectrum and possible mechanism of carrageenan cytotoxicity. *Am. J. Pathol.* 64:387-404; 1971.

58. **Centers for Disease Control:** Increase in national hospital discharge survey rates for septicaemia - United States, 1979-1987. *MMWR.* 39:31-34; 1987.

59. **Cerami A:** Inflammatory cytokines. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62:3-10; 1992.

60. **Chaudhri G, Clark IA:** Reactive oxygen species facilitate the *in vitro* and *in vivo* lipopolisaccharide -induced release of tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 143:1290-1294; 1989.

61. **Chedid L, Parant F, Parant M, Boyer F:** Localization and fate ^{51}Cr -labelled somatic antigens of smooth and rough *Salmonellae*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 133:712-726; 1966.
62. **Chedid L, Rousselot C, Parant M:** In vitro fixation and degradation of radioactive endotoxin by the RES in BCG-treated mice. In "The Rethiculoendothelial System and Immune Phenomena" (Di Luzio NR ed), Plenum press, London, pp. 173-182; 1971.
63. **Cohen J, Glauser MP:** Septic shock: treatment. Lancet 338:736-739; 1991.
64. **Coley WB:** The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas, with a report of ten original cases. Am. J. Med. Sci. 105:487-511; 1893.
65. **Colman RW:** The role of plasma proteases in septic shock. N. Engl. J. Med. 320:1207-1209; 1989.
66. **Crofton RW, Martino MC, Diesselhof-den Dulk MMC, Van Furth R:** The origin kinetics and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. J. Exp. Med. 148:1-17; 1978.
67. **Crowley BM, Mannick JA, Rodrick ML..:** Antiendotoxin therapy improves survival in a model of thermal injury and sepsis. Surgical Forum 41:72-74; 1990.
68. **Csordás T, Bertók L:** Effect of lead acetate on the endotoxin susceptibility of pregnant rats. Acta Chir. Acad. Sci. Hung. 23:9-13; 1982.

69. **Davies PH, Bonney RJ, Humes JL, Kuehl FA:** The role of macrophage secretory products in chronic inflammatory processes. *J. Invest. Dermatol.* 74: 292-296; 1980.
70. **Decker K:** Eicosanoids, signal molecules of liver cells. *Semin. Liver. Dis.* 5:175-190; 1985.
71. **Decker K:** Biologically active products of stimulated liver macrophages [Kupffer cells] *FEBS* 192: 245-261; 1990.
72. **Decker T, Lohmann-Matthes ML, Karck U, Peters T, Decker K:** Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages. *J. Leukocyte. Biol.* 45: 139-146; 1989.
73. **Degliantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis MK, Perussia B, Trinchieri G:** Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. *J. Exp. Med.* 162:1512-1530; 1985.
74. **de Groote MA, Martin MA, Densen P, Pfaller MA, Wenzel RP:** Plasma tumor necrosis factor levels in patients with presumed sepsis. *JAMA* 262:249-251; 1989.
75. **Djeu JH, Blanchard DK, Halkias D, Friedman H:** Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon gamma and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 137:2980-2984; 1986.

76. Dejana E, Bussolino, Mussoni L, Gramse M, Pintucci G, Dinarello CA, Van Damma J, Mantovani: Modulation of endothelial cell functions by different molecular species of interleukin 1. *Blood*. 69:695-999; 1987.

77. Di Luzio NR, Al-Tuwaijri A, Williams DL, Kitahama A, Browder W: Modulation of host susceptibility to endotoxin by reticuloendothelial system stimulation or depression. in *Bacterial Endotoxins and host response* (Agarwal MK. ed.). Elsevier&North-Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, Oxford, old.:71-78, 1980.

78. Di Luzio NR, Crafton LG: Influence of altered reticuloendothelial function on vascular clearance and tissue distribution of *Staphylococcus enteriditis* endotoxin. *Proc. Exptl. Biol Med*. 132:686-690; 1969.

79. Di Luzio NR, Woolees WR: Depression of phagocytic activity by methylpalmitate. *Amer. J. Physiol*. 206:939-943; 1964.

80. Dinarello CA: Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis* 6:55-95; 1984.

81. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, OConnor JV: Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J. Exp. Med*. 163:1433-1450; 1986.

82. **Dinarelo CA, Gelfand JA, Wolff SM:** Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA*. 269:1829-1835; 1993.
83. **Erametsa O, Sihvonen ML, Forssen A:** Rare earth in the human body. I. Yttrium. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 46:179-184; 1968.
84. **Evans GF, Zuckerman SH:** Glucocorticoid-dependent and -independent mechanisms involved in lipopolysaccharide tolerance. *Eur. J. Immunol.* 21:1973-1979; 1991.
85. **Fachet J, Stark E, Palkovits M:** Egyetlen neonatalis glycocorticoid injekció hatása a thymus-nyirok és endokrin rendszerre, valamint a növekedésre patkányban és kutyában. *Orvostudomány* 20:161-173; 1969.
86. **Fanslow WC, Sims JE, Sassanfeld H, Morrissey PJ, Gillis S, Dower SK, Widmer MB:** Regulation of alloreactivity in vivo by a soluble form of the interleukin-1 receptor. *Science* 248:739-742; 1990.
87. **Feingold KR, Grunfeld C:** Tumor necrosis factor-alpha stimulates hepatic lipogenesis in rat in vivo. *J. Clin. Invest.* 80:184-190; 1987.
88. **Filkins JP:** Counter-insulin therapy for endotoxin shock. *J. Reticuloendothel. Soc.* 20. Suppl.13a; 1976.

89. **Filkins JP, Buchanan BJ:** Effects of lead acetate on sensitivity to shock, intravascular carbon and endotoxin clearances and hepatic endotoxin detoxification. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1423: 471-475; 1979.

90. **Fine J:** The bacterial factor in traumatic shock. Springfield, Illionis: Charles C, Thomas, 1954.

91. **Fine J, Rutenberg S, Schweinburg FB:** The role of the reticuloendothelial system in haemorrhagic shock. *J. Exp. Med.* 110:547-569; 1959.

92. **Finlay WEI, McKee JI,** Serum cortisol levels in severely stressed patients. *Lancet* i:1414-1415; 1982.

93. **Fischer CJ Jr., Dhalnaut JF, Pribble JP, Knaus WA and the IL-1 Receptor Antagonist Study Group:** A study evaluating the safety and efficiacy of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Presented at the 13th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine; Brussels, Belgium, March 23, 1993.

94. **Fong Y, Moldawer LL, Marano M:** Cachectin, TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body protein. *Am. J. Physiol.* 256:R659-65; 1989.

95. **Fraker DL, Norton JA:** TNF and endotoxin: cross-tolerance by different mechanisms. *Surg. Forum* 39:15-17; 1988.

- 96. Galanos C, Luderitz O, Westphal O:** Preparation and properties of antisera against the lipid A component of bacterial lipopolisaccharides. *Eur. J. Biochem.* 24: 116-; 1971.
- 97. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA:** Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8667-8671; 1985.
- 98. Garcia R, Abarca S, Municio AM:** Adrenal gland function in reversible endotoxin shock. *Circ. Shock.* 30:365-374; 1990.
- 99. Gershewald JE, Fong YM, Fahey TJ, Calvano SE, Chizzonite R, Kilian PL, Lowry SF, Moldawer LL:** Interleukin 1 receptor blockade attenuates the host inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4966-4970; 1990.
- 100. Girardin E, Grau GE, Dayer JM, Roux-Lombard P, J5 Study Group, Lambert PH:** Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N. Engl. J. Med.* 319:397-400; 1988.
- 101. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J:** Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338:732-736; 1991.
- 102. Gogenheim J, Charpentier B, Gigou M, Cuomo O, Calise F, Amarosa L, Astarcioglu II, Folch MT, Martin B, Bismuth H:** Delayed rejection of heart allografts after extracorporeal donor-specific liver hemoperfusion. *Transplantation* 45: 628-632; 1988.

103. **Gordon S, Todd J, Cohn ZA:** In vitro synthesis and secretion of lysozyme by mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 139:1228-1248; 1974.
104. **Govier WC:** Reticuloendothelial cells as the site of sulfonamide acetylation in the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 150: 305-308; 1965.
105. **Gray JS, Sterling K:** The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. *J. Clin. Invest.* 29:1604-1613; 1950.
106. **Gery I, Davies P, Derr J,:** Relationship between the production and release of lymphocyte-activating factor (IL1) by murine macrophages. I. Effects of various agents. *Cell Immunol.* 131: 293-303; 1981.
107. **Green S, Dobrjansky A, Chiasson MA, Carswell E, Schwarty MK, Old LJ:** *Corynebacterium parvum* as the priming agent in the production of tumor necrosis factor in the mouse. *J. Natl. Cancer. Inst.* 59:1519-1522; 1977.
108. **Greenman RL, Schein RMH, Martin MA, Wenzel RP, Macintyre NR, Emmanuel G, Chmel H, Kohler RB, McCarthy M, Plouffe J, Russel JA, and XOMA Sepsis Study Group:** Controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of Gram-negative sepsis. *JAMA.* 266:1097-1102; 1991.
109. **Guy MW:** Serum and tissue fluid lipids in rabbits experimentally infected with *Trypanosoma brucei*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69:429a; 1975.

110. **Hack CE, Nuijens JH, Felt-Bersma RJF:** Elevated plasma levels of anaphylatoxins C3a and CA4 are associated with fatal-outcome in sepsis. *Am. J. Med.* 86:20-26; 1989.
111. **Hahn EO, Houser HB, Rammelkamp CH, Denny FW, Wannamaker LW:** Effect of cortisone on acute streptococcal infections and post-streptococcal complications. *J. Clin. Invest.* 30:274-281; 1951.
112. **Haley TJ:** Pharmacology and toxicology of the rare earth elements. *J. Pharm. Sci.* 54:663-670; 1965.
113. **Hall DL, Broom JS, Brunson JG:** Effect of epinephrine tolerance on the Schwartzman phenomenon. *Am. J. Pathol.* 44: 431-440; 1964.
114. **Hammerschmidt DE, White JG, Craddock PR, Jacob HS:** Corticosteroids inhibit complement-induced granulocyte aggregation : a possible mechanism for their efficacy in shock states. *J. Clin Invest.* 63: 798-803; 1979.
115. **Hartwell JL, Shear MJ, Adams JR:** Chemical treatment of tumors -VII. Nature of the hemorrhage producing fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. *J. Natl. Cancer Inst.* 35: 107-122; 1965.
116. **Helfgott DC, May LT, Stoecker Z, Tamm I, Sehgal PB:** Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta-2 interferon by human fibroblast. *J. Exp. Med.* 166:1300-1309; 1987.

117. **Hermus ERMM, Sweep CGJ:** Cytokines and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 37:867-871; 1990.
118. **Hinshaw LB:** Design and conduct of clinical trials: development of clinical study based on animal data. In: *Perspective in shock research* (Bond F, Adams HR, Chaudry IS eds.) New York, Alan R. Liss. old.51-60; 1988.
119. **Hinshaw LB, Beller BK, Chang ACK, Murray CK, Flournoay DJ, Passey RB, Archner LT:** Corticosteroid/antibiotic treatment of adrenalectomized dogs challenged with lethal *E. coli*. *Circ. Shock* 16:265-277; 1985.
120. **Hinshaw LB, Jordan MM, Vick JA:** Histamine release and endotoxin shock in primate. *Clin Invest.* 40: 1631-1637; 1961.
121. **Hirata F, Schiffman E, Venkatasubramanian K, Solomon D, Axelrod J:** A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:2533-2536; 1980.
122. **Hotez PJ, Le Trang N, Fairlamb AH, Cerami A:** Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells hematoprotozoan induced mediator from peritoneal exudate cells. *Parasite Immunol.* 6: 203-209; 1984.
123. **Huber AR, Kundel SL, Todd RT III, Weiss SJ:** Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous IL-8. *Science.* 254:99-102; 1991.
124. **Hughes IA:** Steroids and growth. *Brit. Med. J.* 295:683-684; 1987.

125. **Humes JL, Bonney RJ, Pelus L, Dahlgren ME, Sadowski S, Kuehl FA Jr, Davies P:** Macrophages synthesize and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. *Nature* 269: 149-151, 1977.

126. **Husztik E, Lázár G, Szilágyi S:** Study on the mechanism of Kupffer cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. In *^Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells^*. Ed. by E. Wisse and D.L. Knook, Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford pp.387-395, 1977.

127. **Husztik E, Lázár G, Párducz A:** Electron microscopic study of Kupffer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. *Brit. J. Exp. Pathol.* 61:624-630; 1980.

128. **Ismahan G, Agarwal MK:** Glucocorticoid antagonism by bacterial endotoxins. in Agarwal MK (ed): *Antihormones*. Amsterdam, Elsevier\North Holland, pp 95-110, 1979.

129. **Isphani P, Pearson NJ, Greenwood D:** An analysis community and hospital-acquired bacteremia in a large teaching hospital in the United Kingdom. *Q. J. Med.* 241:427-440; 1987.

130. **Jacobs HS:** The role of activated complement and granulocytes in shock states and myocardial infections. *J. Lab. Clin. Med.* 98:645-654; 1981.

131. **Jancsó N:** *Speicherung*. Akadémiai kiadó, Budapest, 1955.

- 132. Jancsó M:** Inflammation and the inflammatory mechanism. *J. Pharm. Pharmacol.* 13:577-594; 1961.
- 133. Jaffe RH:** The reticulo-endothelial system in immunity. *Physiol. Rev.* 11:277-327; 1931.
- 134. Jeffries CD:** Liver carbohydrate levels in mice treated with endotoxin, cortisone and Elipten. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 132:540-542; 1969.
- 135. Kádas J, Jobst K:** Liver damage induced by lanthanum trichloride. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* 21:27-37, 1973.
- 136. Kamei T, Callery MP, Wayne Flye M:** Kupffer cell blockade prevents induction of portal tolerance in rat cardiac allograft transplantation. *Surg. Res.* 48:393-396; 1990.
- 137. Kendall EC:** Cortisone. New York, Scribners, 1971.
- 138. Kertai P, Ujhelyi K, Somogyi L:** A sympathico-adrenális rendszer és a glukagon szerepe az endotoxin kiváltotta hyperglykaemiában. *Kísérletes. Orvostud.* 27:12-19; 1975.

139. Kilbourn RG, Gross SS, Jubran A, Adams J, Griffith OW, Levi R, Lodato RF: N-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:3629-; 1990.

140. Kisida E, Bertók L, Karika G: Toxicity of peritoneal fluids from dogs with an occluded superior mesenteric artery. *J. Reticuloendothel. Soc.* 15:13-15; 1974.

141. Klastersky J, Cappel R, Debusschier L: Effectiveness of bethamethason in management of severe infections. *N. Engl. J. Med.* 284:1248-1250; 1971.

142. Knudsen PJ, Dinarello CA, Storm TB: Glucocorticoids inhibit transcriptional and posttranscriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J. Immunol.* 139:4129-4131; 1987.

143. Kováts TG, Lázár G, Végh P: Glycoprotein changes in the course of Shwartzman phenomenon. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 17:343-348; 1960.

144. Kováts TG: Local endotoxin hypersensitivity and its relation to the Shwartzman phenomenon. *Nature (Lond.)* 190: 177-178; 1961.

145. Kováts TG, Lázár G, Végh P: The phenomenon of endotoxin hypersensitivity and its relation to the Shwartzman phenomenon. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 23:169-198; 1961.

146. Kramsch DM, Aspen AJ, Apstein CS: Suppression of experimental atherosclerosis by the Ca^{++} -antagonist lanthanum. Possible role of calcium in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 65: 967-981; 1980.

147. Kull FC Jr: Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 153:402-409; 1988.

148. Lautenschlager I: Characteristics of the strongly Ia-positive cells in the rat liver. *Scand. J. Immunol.* 20:333-338; 1984.

149. Lázár G: The reticuloendothelial-blocking effect of rare earth metals in rats. *J. Endothelial. Soc.* 13:231-237; 1973.

150. Lázár G, Agarwal MK: Physiological action and receptor binding of a newly synthesised and novel antiglucocorticoid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 134:44-50; 1986a.

151. Lázár G, Agarwal MK: The influence of novel glucocorticoid antagonist on endotoxin lethality in mice strains. *Biochem. Med. Met. Biol.* 36:70-74; 1986b.

152. Lázár G, Husztik E, Török I, Karády I: Hisztokémiai és elektromikroszkópos változások Phlogodym hatására patkánymájban. *Kísérletes. Orvostud.* 22: 478-481; 1970.

- 153. Lázár G, Husztik E, Ribárszki S, Pintér S:** Dissociation of tissue localization of endotoxin from endotoxin lethality. in: Agarwal MK, Yoshida M (eds): Immunopharmacology of Endotoxycosis. Walter de Gruyter Co. Berlin, New York, pp.1-10; 1984.
- 154. Lázár G, Husztik E:** Functional consequences of the reticuloendothelial blockade induced by gadolinium chloride. *Experientia* 41:516; 1985a.
- 155. Lázár G, Husztik E, Ribárszki S:** Rethiculoendothelial blockade induced by gadolinium chloride, effect on the humoral immune response and anaphylaxis. *Macrophage Biology* 571-582, Alan R. Liss, Inc. 1985b.
- 156. Lázár G, Karády S, Husztik E:** Effect of Phlogodym on tourniquet shock. *Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg.)* 21: 159-165; 1969.
- 157. Lázár G, Kováts TG, Reök A, Takáts I:** Changes in fat metabolism in the course of Shwartzman phenomenon. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 17:335-341; 1960.
- 158. Lázár G, Lázár Jr, Husztik E, Fekete M:** Prevention of anaphylactic death by macrophage blockade. *Acta Physiologica Hungarica.* 77:231-236; 1991.
- 159. Lázár G, Selye H:** Production of cardiac calcification by erbium chloride and trauma. *Acta Cardiol.* 1973.

- 160. Lázár G Jr, Husztik E, Lázár G:** The effect of endotoxin and gadolinium chloride on the acute septic peritonitis in rats. *J. Leukocyte Biology*, 36:197-198; 1984.
- 161. Lázár G Jr:** Effect of endotoxin and gadolinium chloride on the severity of acute septic peritonitis in splenectomized rats. *Acta Physiol. Acad Sci Hung* 68: 390; 1986.
- 162. Lázár G Jr, Husztik E, Lázár G:** Effects of endotoxin and gadolinium chloride on acute septic peritonitis and septic shock in rats. *Monitoring and Treatment of Shock*. Eds.: G. Schlag and H. Redl, *Progress in Clinical and Biological Research*. Vol. 236B: 324-328; 1987.
- 163. Lázár G Jr, Lázár G, Agarwal MK:** Effect of the glucocorticoid antagonist RU 38486 on septic shock. *Circulatory Shock* 31:225; 1990.
- 164. Lázár G, Lázár G Jr, Agarwal MK:** Antigluccorticoid exacerbates shock. in *Antihormones in health and disease*, Ed.: MK Agarwal, Karger Company, Basel, pp. 36-45; 1990b.
- 165. Lázár G Jr, Lázár G, Duda E, Agarwall MK:** Effect of the glucocorticoid antagonist, RU 38486, on survival and TNF production during septic and endotoxin shock. *Circulatory Shock* 34:60; 1991.
- 166. Lázár G Jr, Lázár G, Agarwall MK:** Modification of septic shock in mice by the antigluccorticoid RU 38486. *Circulatory Shock* 36:180-184; 1992a.

- 167. Lázár G Jr, Lázár G, Duda E:** Effect of RU 38486 on the TNF production and toxicity. *Eur. Surg. Res.* 24,s2:29; 1992b.
- 168. Lázár G Jr, Duda E, Lázár G:** Effect of RU 38486 on TNF production and toxicity. *FEBS Letters* 308: 137-1940; 1992c.
- 169. Lázár G Jr, Lázár G, Agarwal MK:** The antiglucocorticoid RU 38486 reverses the wasting syndrome in newborn rats. *Naturwissenschaften*, 79:472-473; 1992d.
- 170. Lázár G Jr, Lázár G jr, Kiss I, Duda E:** Effect of Kupffer cell phagocytosis blockade on the tumor necrosis factor (TNF) production by bacterial endotoxin. *Eur. Cyt. Netw.* 3:196; 1992e.
- 171. Lee L:** Reticuloendothelial clearance of circulating fibrin in the pathogenesis of the generalized Shwartzman reaction. *J. Exp. Med.* 115:1065-1082, 1962.
- 172. Leon P, Redmund HP, Shou J, Daly JM:** Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Arch. Surg.* 127:146-151; 1992.
- 173. Libert C, Van Bladel S, Brouckaert P, Fiers W:** The influence of modulating substances on tumor necrosis factor and interleukin-6 levels after injection of murine tumor necrosis factor or lipopolisaccharide in mice. *J. Immunother.* 10:227-235; 1991.

174. Liggins GC: Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J. Endocrinol.* 45: 515; 1969.

175. Liley HG, White RT, Warr RG, Benson BJ, Hawgood S, Ballard PL: Regulation of messenger RNAs for the hydrophobic surfactant proteins in human lung. *J. Clin. Invest.* 83:1191-1197; 1989.

176. Lozman J, Dutton RE, English M, Powers SR Jr: Cardiopulmonary adjustments following single high dosage administration of methylprednisolone in traumatized man. *Ann. Surg.* 181:317-324; 1975.

177. Luderitz O, Staub A, Wethpal O: Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*, *Bacterol. Rev.* 30: 192-; 1966.

178. Lucas CE, Ledgerwood AM: The cardiopulmonary response to massive doses of steroids in patients with septic shock. *Arch. Surg.* 119:537-541; 1984.

179. Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Turner J, Metz CA, Murray JF: Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:62-68; 1988.

180. Magnusson G: The behavior of certain lanthanons in rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 20, Suppl.3:1-95; 1963.

181. Mai A, Duda E, Tóth M, Galiba E: Eljárás természetes emberi TNF előállítására. Szabadalom száma: 2030\90. Bejelentés: 1990.

182. Martich GD, Danner RI, Ceska, Suffedrini AF: Detection interleukin-8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. *J. Exp. Med.* 173:1021-1024; 1991.

183. McCallum RE, Stith RD: Endotoxin-induced inhibition of steroid binding by mouse liver cytosol. *Circ. Shock.* 9:357-367; 1982.

184. McCuskey RS, McCuskey PA, Urbaschek R, Urbaschek B: Kupffer cell function in host defense. *Rev. Infect. Dis.* vol.9. Suppl.5: 616-619; 1987.

185. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, ODwyer S, Dinorello CA, Cerami A, Wolf SM, Wilmure DW: Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N. Eng. J. Med.* 318:1481-1486; 1988.

186. Mizoguchi Y, Ichikawa Y, Kioka K, Kawada N, Kobayashi K, Yamamoto S: Effects of archidonic acid metabolites and interleukin-1 on platlet activating factor production by hepatic sinusoidal endothelial cells from mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6:283-288; 1991.

187. Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML: Cytokines, sepsis and immunomodulation. *Br. J. Surg.* 80:289-297; 1993.

188. Moser R, Schleiffenbaum B, Groscurth P, Fehr J: Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate human vascular endothelial cells to promote transendothelial neutrophil passage. *J. Clin. Invest.* 83:444-455; 1989.

- 189. Motsay GJ, Alho A, Jaeger T, Dietyman RH, Lillehei RC:** Effects of corticosteroids on the circulation in shock: experimental and clinical results. *Fed. Proc.* 29:1861-1873; 1970.
- 190. Murray HW, Cohn ZA:** Mononuclear phagocyte antimicrobial and antitumor activity: the role of oxygen intermediates. *J. Invest. Dermatol.* 74: 285-259; 1980.
- 191. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR:** Pulmonary perspectives: An expanded definition of adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:720-723; 1988.
- 192. Nagy S, Barankay T, Horpácsy G, Petri G:** Effect of corticosteroid treatment on splanchnic blood flow in hemorrhagic shock. *Eur. Surg. Res.* 2:163-168; 1970.
- 193. Nagy S, Tárnoky K, Petri G:** Effect of water-soluble corticosteroid analogue in experimental hemorrhagic shock. *J. Surg. Res.* 4:62-69; 1964.
- 194. Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichhacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Banks SM, Mac Vittie TJ, Parrilo JE:** Endotoxin and tumor necrosis factor challenge in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J. Exp. Med.* 169:823-832; 1989.
- 195. National Center for Health Statistics:** Annual Summary of Birth, Marriages, Divorces, and Death: United States, 1989.

- 196. Nawroth PP, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess, Stern D:** Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J. Exp. Med.* 163:1363-1375; 1986.

- 197. Nelson DS:** Macrophages: progress and problems. *Clin. exp. Immunol.* 45:225-233; 1981.

- 198. Nieman LK, Loriaux DL:** Clinical applications of the glucocorticoid and progestin antagonist RU 486. in: *Receptor mediated antisteroid action* (Agarwal MK ed.) Berlin:de Gruyter old. 77-98, 1987.

- 199. Nowotny A:** Molecular aspects of endotoxin reactions. *Bact. Rev.* 33:72-98; 1969.

- 200. Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC:** Interleukin 1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature.* 348:550-552; 1990.

- 201. Okusawa S, Gelfond JA, Ikejama T, Connally RJ, Dinorello CA:** Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. *J. Clin. Invest.* 81:1162-1172; 1988.

- 202. Olstad R, Degré M, Seljelid R:** Production of immune interferon (Type II) in concultures of mouse peritoneal macrophages and syngeneic tumour cells. *Scand. J. Immunol.* 13: 605-608; 1981.

203. OMalley WE, Achinstein B, Shear MJ: Action of bacterial polysaccharide on tumors - II Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. J. Natl. Cancer Inst. 29: 1169-1175; 1962.

204. Oppenheim JJ, Stadler BM, Siraganian RP, Mage M, Mathiesin B: Lymphokines: their role in lymphocyte responses: properties of interleukin 1. Federation Proceedings 41: 257-262; 1982.

205. Orbán I, Bertók L, Regős J, Gázsó L: Role of bacterial endotoxins in the tourniquet shock in rats. Acta Chir. Acad. Sci. Hung. 19:399-404; 1978.

206. Oyangui Y: Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot oedema. Biochem. Pharmacol. 25:1465-1472; 1976.

207. Oyvin JA, Baluda VP, Shegel SM, Tokarew OY, Venglinskaya, EA, Yagodkina EG: Anticoagulant and antiphlogistic properties of Phlogodym (neodymium pyrocatechol disulfonate). Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 24:373-379. 1964.

208. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium -derived relaxing factor. Nature 327:524-526;1987.

209. Parant F, Tavernier J, Fiers W, Parant M: Comparative activity of human and murine tumor necrosis factor in toxicity and anti-infectious assays in mice. Microb. Pathogen. 8:143-149; 1990.

210. Parker MM: Current management of septic shock. *Infections in Medicine* 5: 5-9; 1990.

211. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffedrini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP: NIH Conference. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann. Intern. Med.* 113:227-242; 1990.

212. Peavy DL, Baughn RE, Musher DM: Effects, of BCG infection on the susceptibility of mouse macrophages to endotoxin. *Infect. Immun.* 24:59-64; 1979.

213. Person HJ, Anderson J, Chamberlain J, Bell PRF: The effect Kupffer cell stimulation or depression on the development of liver metastases in the rat. *Cancer Immunol. Immunother.* 23:214-216; 1986.

214. Peschle C, Marone G, Genovese A, Rappaport IA, Condorelli M: Increased erythropoietin production in anephric rats with hyperplasia of the reticuloendothelial system induced by colloidal carbon or zymosan. *Blood* 47:325-337; 1976.

215. Petrak RA, Balk RA, Bone RC: Prostaglandins, Cyclo-oxygenase inhibitors, and thromboxane synthetase inhibitors in the pathogenesis of multiple systems organ failure. *Crit. Care Clinics* 5:303-314; 1989.

216. Petri G: Steroidok a sebészetben. Korányi Sándor Társaság Tudományos Ülései (Szerkesztők: Rajka Ö, Zoltán J.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 79-91 old.; 1965.

217. Philibert D: RU 38486: An original multifaceted antihormone in vivo. In Agarwal MK [ed]: ~Adrenal Steroid Antagonism~ Berlin, New York, Walter de Gruyter, pp 77-97, 1984.

218. Philip R, Epstein LB: Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, interferon gamma and interleukin-1. *Nature* 32:86-89; 1986

219. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:10043-10047; 1990.

220. Rampart M, van Damme J, Zonnekeyn L, Herman AG: Granulocyte chemotactic protein-interleukin-8 induces plasma leakage and neutrophil accumulation in rabbit skin. *Am. J. Pathol.* 135:21-25; 1989.

221. Raz A, Wyche A, Siegel N, Needleman P: Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin 1. *J. Biol. Chem.* 263:3022-3028; 1988.

222. Rees DD, Celtek S, Palmer RMJ, Moncada S: Dexamethason prevents the induction by endotoxin of nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:541-547; 1990.

223. Reines HD, Halushka PV, Cook Ja, Wise WC, Rambo W: Plasma thromboxane concentrations are raised in patients dying with septic shock. *Lancet* ii:174-175; 1982.

224. Richman LK, Klingenstein RJ, Richman JA, Strober W, Berzofsky JA: The murine Kupffer cell. I. Characterization of the cell serving accessory function in antigen-specific T cell proliferation. *J. Immunol.* 123:2601-2609; 1979.

225. Rock CS, Lowry SFL: Tumor necrosis factor. *J. Surg. Res.* 51:434-445; 1991.

226. Rodger MW, Baird DT: Induction of therapeutic abortion in early pregnancy with mifepristone in combination with prostaglandin pessary. *Lancet* 2:1415-1418; 1987.

227. Rogers J: Large doses of steroids in septicaemic shock. *Br. J. Urol.* 42:742; 1970.

228. Rogoff TM, Lipsky PE: Antigen presentation by isolated guinea pig Kupffer cells. *J. Immunol.* 124:1740-1744; 1980.

229. Roh MS, Drazenovich KA, Barbose JJ,,: Direct stimulation of the adrenal cortex by interleukin-1. *Surgery* 102:140-146; 1987.

230. Rooney SA: The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131:439-460; 1985.

231. Rothstein JL, Schreiber H: Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 607-611; 1988.

232. Rothwell PM, Udwadia ZF, Lawler PG: Cortisol response to corticotropin and survival in septic shock. *Lancet* 337:582-583; 1991.

233. Sanchez-Cantu L, Rode HN, Christou NV: Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. *Arch. Surg.* 124:1432-1436; 1989.

234. Santos AA, Scheltinga MR, Lynch E, Brown EF, Lawton P, Chambers E, Browing J, Dinarello CO, Wolff SM, Wilmore DW: Elaboration of interleukin 1-receptor antagonist is not attenuated by glucocorticoids after endotoxaemia. *Arch. Surg.* 128:138-144; 1993.

235. Sato N, Goto T, Haranaka K, Satomi N, Nariuchi H, Mano-Hirano Y, Sawasaki Y: Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition and cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* 76:1113-1121; 1986.

236. Schade UF, Ernst M, Reinke M, Wolter DT: Lipoxygenase inhibitors suppress formation of tumor necrosis factor *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:748-754; 1989.

- 237. Schayer RW:** Relationship of induced histidine decarboxylase activity and histamine synthesis to shock from stress and from endotoxin. *Am J. Physiol.* 198: 1187-1192; 1960.
- 238. Schein RMH, Sprung CL, Marcial E, Napolitano L, Chernow B:** Plasma cortisol levels in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 18:259-263; 1990.
- 240. Schlesinger M, Mark R:** Wasting disease induced in young mice by administration of cortisol acetate. *Science*, 143:965-966; 1964.
- 241. Schoeffel U, Windfuhr M, Freudenberg N, Treutner KH, Jacobs E, Galanos CH:** The role of intestinal endotoxin in experimental peritonitis. *Circ. Shock* 27:83-91; 1989.
- 242. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Graz PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ:** Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431; 1990.
- 243. Schurer W:** Influence of pharmacologic agents on tissue metabolism in circulatory shock. *Crit. Care. Med.* 3:109-114; 1975.
- 244. Schurer W:** Steroids in the treatment of clinical septic shock. *Ann. Surg.* 184:333-339; 1976.
- 245. Selye H:** Textbook of Endocrinology. Montreal, University of Montreal, 1947.

- 246. Selye H:** Calciphylaxis. The University of Chicago Press, Chicago, 1962.
- 247. Selye H, Tuchweber B, Bertók L:** Effect of lead acetate on the susceptibility of rats to bacterial endotoxins. *J. Bacteriol.* 91: 884-890, 1966.
- 248. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svederesky LP, Finkle BS, Palladino MA:** Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- γ and tumor necrosis factors. *J. Immunol.* 135:2069-2073; 1985.
- 249. Shalaby MR, Waage A, Aarden L, Espvik T:** Endotoxin, Tumor Necrosis Factor - and Interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53:488-498; 1989.
- 250. Sherman ML, Spriggs DR, Arthur KA:** Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: Phase I: Toxicity and effects on lipid metabolism. *J. Clin. Oncol.* (6)2:344-350; 1988.
- 251. Sibbald WJ, Short A, Cohen MP, Wilson RF:** Variations in adrenocortical responsiveness during severe bacterial infections. *Ann.Surg.* 186:29-33; 1977.
- 252. Siegel MI, McConnell RT, Bonser RW, Cuatrecasas P:** The production of 5-HETE and leukotriene B in rat neutrophils from carrageenan pleural exudates. *Prostaglandins* 21:123-132; 1981.
- 253. Silvestre L, Dubois C, Renult M, Rezvani Y, Baulieu EE, Ulman A:** Voluntary interruption of pregnancy with mifepristone (RU 486) and a

prostaglandin analogue: a large-scale French experience. *N. Engl. J. Med.* 322: 645-648; 1990.

254. Sjölin J: High-dose corticosteroid therapy in human septic shock: Has the jury reached a correct verdict? *Circ. Shock* 35: 139-151; 1991.

255. Skubitz KM, Craddock PR, Hammerschmidt DE August JT: Corticosteroids block binding of chemotactic peptide to its receptor on granulocytes and cause disaggregation of granulocyte aggregates in vitro. *J. Clin Invest.* 68:13-20; 1981.

256. Smith JW, Urba W, Curti BD, Elwood LJ, Steis RG, Janik JE, Shaefman WH, Miller LL, Fenton RG, Conlon KC: The toxic and hematologic effects of Interleukin 1 alpha administered in phase I trial to patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 10:1141-1152; 1992.

257. Snyder F, Cress EA, Kyker GC: Liver lipid response to intravenous rare earths in rats. *J. Lipid Res.* 1:125-131; 1959.

258. Söderling E, Knuutila M: Release of the chloride-dependent arginine aminopeptidase from PMN leukocytes and macrophages during phagocytosis. *Life. Sci.* 26: 303-312; 1980.

259. Spika JS, Peterson PK, Wilkinson BJ, Hammerschmidt DE, Verburgh HA, Verhoef J, Quie PG: Role of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* in leukopenia, thrombocytopenia, and complement activation associated with bacteremia. *J. Infect. Dis.* 146:227-234; 1982.

260. Splawinski JA, Wojtaszek B, Sines J, Gryglewski RJ: Endogeneous factors affecting arachidonic acid metabolism. I. Biosynthesis of prostacyclin and prostaglandins by carrageenan granulomas of rats. *Prostaglandins*. 16:683-697; 1978.

261. Spooner CE, Markowitz NP, Saravolatz LD: The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62:11-17; 1992.

262. Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH, Pierce M, Gelbard MA, Long WM, Duncan RC, Tendler MD, Karpf M: The effect of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. *N. Engl. J. Med.* 311:1137-1143; 1984.

263. Sprung CL, Schein MH, Lang WM: Corticosteroids and nonsteroidal antiinflammatory agents in the sepsis syndrome. in: *Sepsis, an interdisciplinary challenge* (Reinhart K, Ezrich K eds.) old. 87-96; 1989.

264. Stiffel C: Etude de la fonction phagocytaire des cellules du système réticulo-endothélial au contact du sang. D. sc. Thesis, University of Paris. Poitiers-S.F.I.L. et Imp. Marc. Taxier Réunies, 1959.

265. Stith RD, McCallum RE: Down regulation of hepatic glucocorticoid receptors after endotoxin treatment. *Infect. Immun.* 40:613-621; 1983.

266. Stith RD, McCallum RE: General effect of endotoxin on glucocorticoid receptors in mammalian tissues. *Circ. Shock.* 18:301-309; 1986.

267. Sultzzer BM: Genetic control of leukocyte responses to endotoxin. *Nature* 219:1253-1254; 1968.

268. Suffredini AE: Endotoxin administration to humans: A model of inflammatory responses relevant to sepsis. In Lamy M., Thijs LG (eds): *Mediators of Sepsis*, Springer Verlag, pp.13-31; 1992.

269. Suffys P, Beyaert R, Van Roy F, Fiers W: TNF in combination with interferon- γ is cytotoxic to normal, untransformed mouse and rat embryo fibroblast like cells. *Anticancer Res.* 9:167-172; 1989.

270. Sung SJ, Bjorndahl JM, Wang CY, Kao HT, Fu SM: Production of tumor necrosis factor/cachectin by human T cell lines and peripheral blood T lymphocytes stimulated by phorbol myristate acetate and anti-CD3 antibody. *J. Exp. Med.* 167:837-953; 1988.

271. Sung SJ, Jung LKL, Walters JA, Chen W, Wang CY, Fu SM: Production of tumor necrosis factor/cachectin by human B cell lines and tonsillar B cells. *J. Exp. Med.* 168:1539-1551; 1988.

272. Szilágyi I, Lázár Gy: Neonatális glycocorticoid kezeléssel kiváltott wasting syndroma és hatása a RES aktivitásra. *Kísérletes Orvostudomány* 30:209-214; 1978.

273. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group: Effect of high dose glucocorticoid therapy on mortality in patients with clinical signs of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 317:659-665; 1987.

274. Thomas L: The role of epinephrine in the reactions produced by the endotoxins of Gram-negative bacteria. I. Hemorrhagic necrosis produced by epinephrine in the skin of endotoxin-treated rabbits. *J. Exp. Med.* 104:865-880;1956.

275. Thompson WL; Gurley HT, Lutz BA, Jackson DL, Kvols LK, Morris IA: Inefficacy of glucocorticoids in shock (double-blind study). *Clin. Res.* 24:258A; 1976.

276. Tóth M, Duda E, Mai A: Eljárás rekombináns emberi TNF előállítására. Szabadalom száma: 5578\88, Bejelentés: 1988.

277. Tracey KJ: Trends in shock research: tumor necrosis factor (cachectin) in the biology of septic shock syndrome. *Circ. Shock* 35:123-128; 1991.

278. Tracey KJ, Cerami A: Tumor necrosis factor and regulation of metabolism in infection: role of systemic versus tissue levels. *P.S.E.B.M.* 200:233-239; 1992.

279. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Monoque KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF Cerami A: Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330:662-664; 1986.

280. Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ III, Albert JD, Fong J Z, Hesse D, Beutler B, Manogue KR, Calvano S, Wei H, Cerami A, Shires GT: Cachectin&tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surg. Gynecol. Obstet.* 164:415-422; 1987.

- 281. Tsiyimoto M, Okamura N, Adachi H:** Dexamethasone inhibits the citotoxic activity of tumor necrosis factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 153:109-115; 1988.
- 282. Utili R, Abernathy CO, Yimmerman HJ:** Minireview: Endotoxin effects on the liver. *Life Sciences* 20:553-568; 1977.
- 283. Yamazaki M, Ikenami M, Sugiyama T:** Cytotoxin from polymorphonuclear leukocytes and inflammatory ascitic fluids. *Br. J. Canc.* 59:353-355; 1989.
- 284. Vadas P, Pruzanski W, Stefanski E, Ruse J, Farewell V, McLaughlin J, Bombardier C:** Concordance of endogenous cortisol and phospholipase A₂ levels in gram-negative septic shock: a prospective study. *J. Lab. Clin. Med.* 111:584-590; 1988.
- 285. Van der Poll T, Büller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SHJ, Hack CE, Sauerwien HP, Rosenberg RD, ten Cate JW:** Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N. Engl. J. Med.* 322:1622-1627; 1990.
- 286. Van Deventer SJH, Hart M, Van der Poll T, Hack CE, Aarden LA:** Endotoxin and tumor necrosis factor-induced interleukin-8 release in humans. *J. Infect. Dis.* 167:461-464; 1993.
- 287. Van Rooijen N, Van Nieuwmegen R:** Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection liposome-encapsulated dichloromethane

diphosphate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res.* 238:355-358; 1984.

288. van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF: Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4845-4849; 1992.

289. Waage A: Production and clearance of tumor necrosis factor in rats exposed to endotoxin and dexamethason. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 45:348-355; 1987.

290. Waage A, Brandtvaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espvik T: The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1 and fatal outcome. *J. Exp. Med.* 169: 333-338; 1989.

291. Waage A, Espvik T: Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor-alpha and cachectin in mice. *J. Exp. Med.* 169:823-832; 1989.

292. Warren RS, Donner DB, Starnes HF, Jr, Brennan MP: Modulation of endogenous hormone action by recombinant human tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:8619-8622; 1987

293. Warr TA, Mohan Rao LV, Rapaport SI: Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor:

effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* 75:1481-1489; 1990.

294. Weinberg JB: In vivo modulation of macrophage tumoricidal activity: enhanced tumor cell killing by peritoneal macrophages from mice given injections of sodium periodate. *JNCI*. 66:529-533; 1981.

295. Weissmann G, Thomas L: Studies on lysosomes. I. The effects of endotoxin tolerance and cortisone on the release of acid hydrolases from a granular fractions of rabbit liver. *J. Exp. Med* 116:433-450; 1962.

296. Westphal O, Wethpal U, Sommer T: History of pyrogen research, in *Microbiology 1977*, (Schlessinger D. ed) The American Society of Microbiology; Washington D.C. old. 221, 1977.

297. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* 29:189-201; 1980.

298. Willems J, Joniau M, Cinque S, van Damme J: Human granulocyte chemotactic peptide (IL 8) as a specific neutrophil degranulator: comparasion with other cytokines. *Immunology*. 67:540-542.; 1991.

299. Wong GHW, Goeddal DV: Tumor necrosis factor alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons *Nature* 23: 819-821; 1986.

300. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide(LPS) and LPS binding protein. *Science* 249:1431-1433; 1990.

301. Zechner R, Newman TC, Sherry B, Ceramy A, Breslow JL: Recombinant human cachectin (tumor necrosis factor) but not interleukin-1 downregulates lipoprotein lipase gene expression at the transcriptional level in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 8:2394-23401; 1988.

302. Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, Glauser MP, Sadoff JC, Douglas HBS, Braude A: Treatment of Gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 307:1225-1230; 1982.

303. Ziegler EJ, Fischer CJ, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Foink MP, Dellinger RP, Teng NNH, Allen IE, Berger HJ, Knottend GL, Lobuglio AF, Smith CR, and HA-1A Sepsis Study Group: Treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N. Engl. J. Med.* 324:429-436; 1991.

304. Zimmerman JJ: Oxyradical pathogenesis in sepsis. in: *Mediators of sepsis* (Lamy M, Thijs LG eds.) Springer Verlag old.136-152; 1992.

305. Zuckerman SH, Evans GF, Butler LD: Endotoxin tolerance: Independent Regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect. and Immun.* 59:2774-2780; 1991.

306. Zuckerman SH, Shellhaas J, Butler LD: Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur. J. Immunol.* 19:301-305; 1989.